

Andreia Sofia de Paiva Figueiredo

EXERCÍCIO, LACTATO E CÁRIE DENTÁRIA

Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Coimbra, Outubro de 2009

Andreia Sofia de Paiva Figueiredo

EXERCÍCIO, LACTATO E CÁRIE DENTÁRIA

Orientador: *Professor Doutor Carlos Alberto Fontes Ribeiro*

Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

5º Curso de Mestrado em Patologia Experimental

Coimbra, Outubro de 2009



Dissertação de candidatura ao grau de Mestre, apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de Coimbra

*"Para realizar grandes conquistas, devemos não apenas agir, mas também sonhar; não apenas planejar, mas também acreditar."
(Anatole France)*

Aos meus pais

À minha irmã

Ao meu padrinho

Ao meu namorado

Aos meus familiares

Aos meus amigos

AGRADECIMENTOS

Embora acredite que um investigador estará sempre destinado a um trabalho pautado por alguma solidão, a elaboração desta dissertação não teria sido possível sem o trabalho conjunto de algumas pessoas, que me acompanharam desde o primeiro minuto do primeiro dia. A todas elas o meu sincero obrigado, por terem partilhado comigo estes momentos e tornado mais simples aquilo que ao início me parecia tão difícil...

Ao meu orientador, Professor Carlos Alberto Fontes Ribeiro, o meu sincero muito obrigada por toda a orientação, os conselhos, as ajudas, a compreensão, o empenho, a dedicação. Agradeço-lhe também por ser um exemplo desde a primeira aula do primeiro ano. Sem ele, esta tese não existia. Disso não tenho dúvida.

Ao Professor António Silvério Cabrita agradeço a confiança demonstrada desde o primeiro dia de trabalho conjunto, a motivação, o dinamismo, os ensinamentos e a experiência.

Ao Dr. Rodrigo Farinha Marques agradeço a paciência, as horas passadas no Serviço de Patologia Experimental, as conversas telefónicas tardias e toda a ajuda que podia desejar no desenrolar do protocolo prático.

Ao Dr. Osvaldo Silva agradeço a incondicional ajuda no mais pequeno pormenor, a confiança no meu trabalho, as longas conversas acerca dos problemas que foram surgindo e das propostas de soluções, a companhia nas noites e a partilha de momentos de algum desânimo quando as contrariedades espreitaram. Esta tese também é tua.

Ao Dr. Nélcio Veiga agradeço o incentivo de todos os dias, as conversas científicas e o carinho do costume.

À Dra. Sílvia Amaral agradeço a cedência da quase totalidade dos dentes que foram utilizados neste trabalho, para além da atenção e da ajuda com que sempre me recebeu. É muito estimulante trabalhar com alguém tão capaz. Obrigada também à Elsa e à Catarina pelo contínuo entusiasmo e pelo interesse em saber como as coisas corriam numa base semanal.

Ao meu pai e à minha mãe agradeço a preocupação constante de acompanhar o trabalho, os conselhos nas alturas de maior stress, as orientações sempre bem intencionadas e

sobretudo a forma como sempre me incentivaram a fazer mais e melhor. Agradeço-lhes a participação activa na minha progressão académica. Esta dissertação é nossa.

À minha irmã agradeço o apoio e a atenção, embora distanciadamente. Espero que a tua dissertação te dê tanto prazer na sua elaboração como esta me deu a mim.

Aos meus avós, tios e tias, primos e primas agradeço a vossa presença. Sempre soube que estavam disponíveis se necessário. Ainda bem que não foram precisos!

Aos colegas de Mestrado, Rodrigo, Daniela, José António, Maria João, Vanessa, António Jorge, Paula, Sara e Gabriela agradeço todos os bons momentos passados nas aulas das várias cadeiras, onde tivemos oportunidade de aprender e sobretudo partilhar conhecimentos. Sem vocês as coisas teriam sido diferentes e sem dúvida mais difíceis.

Aos meus professores deste Mestrado em Patologia Experimental o meu agradecimento por me terem ensinado tanto, feito ver coisas diferentes e me terem proporcionado algumas experiências integradoras, particularmente na vertente prática do Mestrado. Ao Professor Fontes, ao Professor Cabrita, ao Professor Patrício, à Professora Francelina, e a todos os outros o meu muito obrigada.

Aos meus amigos obrigada por estarem tão perto quando foi preciso. É assim que concebo a amizade.

ÍNDICE

Índice de figuras	XVII
Índice de gráficos	XXI
Índice de tabelas	XXIII
Resumo	XXV
Abstract	XXVII
Capítulo I – Introdução	29
Capítulo II – Objectivos	33
Capítulo III – Revisão da literatura	37
1. Ácido láctico	39
1.1 Formação do lactato	40
1.2 O lactato é um metabolito anaeróbio?	42
1.3 Lactato e fadiga muscular	44
1.4 Oxidação e metabolização do lactato	45
1.4.1 Shuttle intracelular	46
1.4.2 MCT's	46
1.4.3 Fibras musculares e lactato	48
1.4.4 Shuttle intercelular	50
1.4.5 Remoção do lactato	51
1.5 Regulação do pH: sistemas tampão	52
2. Saliva	56

2.1 Processo de formação da saliva a partir do sangue	58
2.2 Composição salivar	61
2.3 Efeitos do exercício físico na secreção e composição salivares	62
3. Cárie dentária	63
3.1 Determinantes do processo carioso	64
3.2 Curva de Stephan e sua importância clínica	66
3.3 <i>Streptococcus mutans</i>	68
3.4 Progressão da lesão de cárie	69
4. Erosão dentária	71
5. Lactato e cárie/erosão	75
Capítulo IV – Material e Métodos	77
1. Amostra do estudo	79
2. Preparação dos dentes	79
3. Soluções de desmineralização	83
4. Modelo de erosão contínuo	84
5. Modelo de erosão intermitente	85
6. Inclusão e corte no micrótomo	87
7. Análise do padrão de desmineralização	93
8. Mensuração da profundidade de desmineralização	94
9. Análise estatística	95
Capítulo V – Resultados	97

1. Análise relativa ao grupo de exposição de pH 3,5	116
1.1 Análise dos valores de profundidade de desmineralização	116
1.2 Análise estatística entre exposição contínua e intermitente	119
1.3 Análise do padrão de desmineralização	120
2. Análise relativa ao grupo de exposição de pH 4,5	121
2.1 Análise dos valores de profundidade de desmineralização	121
2.2 Análise estatística entre exposição contínua e intermitente	123
2.3 Análise do padrão de desmineralização	124
3. Análise relativa aos grupos de exposição de pH 5,5 e 6,8	124
Capítulo VI – Discussão dos Resultados	125
Capítulo VII – Conclusões	137
Limitações do estudo. Perspectivas futuras.....	140
Capítulo VIII – Bibliografia	143

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1</i> - Isómeros ópticos do ácido láctico, respectivamente o levógiro e o dextrógiro.....	40
<i>Figura 2</i> - Formação de piruvato e lactato a partir da glucose.....	40
<i>Figura 3</i> - Pormenor da conversão de piruvato em lactato.....	41
<i>Figura 4</i> - Processo glicolítico e ciclo de Krebs.	45
<i>Figura 5</i> - Circuito percorrido pelo lactato, sendo que todos os passos são reversíveis.....	50
<i>Figura 6</i> - Mecanismos de regulação do pH.....	53
<i>Figura 7</i> - Factores associados ao controlo do pH intra e extracelular.....	55
<i>Figura 8</i> - Curva de Stephan original.....	66
<i>Figura 9</i> - Curva de Stephan com análise da cariogenicidade.	67
<i>Figura 10</i> - Valores de pH nos quais há uma possível desmineralização do esmalte dentário.	67
<i>Figura 11</i> - Esquema representativo dos valores de pH importantes no que diz respeito o processo carioso.....	70
<i>Figura 12</i> - Desmineralização erosiva do esmalte dentário.....	72
<i>Figura 13</i> - Exemplo de um dente isolado com verniz e identificado com o respectivo número e pormenor da face oclusal do mesmo dente, onde é visível a complexidade de fossas e fissuras.	80
<i>Figura 14</i> - Exemplo de frasco de recolha de fezes utilizado, ainda com a colher no seu interior.....	82
<i>Figura 15</i> - Exemplo de frasco de recolha de fezes utilizado, já sem a colher no seu interior.....	82
<i>Figura 16</i> - Exemplo de frasco utilizado com a totalidade dos dados utilizados para a sua identificação.....	82
<i>Figura 17</i> - Micropipeta Gilson pipetman P1000 e pontas de 1000 µl.	84
<i>Figura 18</i> - Exemplo de dente já sujeito à solução de desmineralização e com o número identificativo escrito sobre o verniz.....	85
<i>Figura 19</i> - Material utilizado para a inclusão dos dentes: os dois componentes do acrílico, a taça de silicone e a vareta de vidro.	88
<i>Figura 20</i> - Exemplo de um dente (nº 60) incluído em resina acrílica, com o respectivo código numérico atribuído.	88
<i>Figura 21</i> - Micrótopo de tecidos duros utilizado, modelo Leitz 1600, da Leica.	89
<i>Figura 22</i> - Garras do micrótopo que permitem a apreensão do objecto a ser cortado.	89

<i>Figura 23</i> - Botão que permite escolher a espessura dos cortes a realizar.	90
<i>Figura 24</i> - Manípulo que permite destravar o micrótomo.....	90
<i>Figura 25</i> - Mangueira que permite o contínuo direccionamento do jacto de água para cima da lâmina de corte.	90
<i>Figura 26</i> - Botão que permite ligar e desligar o micrótomo.....	91
<i>Figura 27</i> - O jacto de água deve ser continuamente mantido sobre a lâmina de corte.	91
<i>Figura 28</i> - Botão de controlo da velocidade de corte.	91
<i>Figura 29</i> - Protecção plástica que é parte integrante do micrótomo utilizado.....	92
<i>Figura 30</i> - Exemplo de cortes dos dentes obtidos no micrótomo, diâmetro e espessura (300 µm).92	
<i>Figura 31</i> - Microscópio Nikon Eclipse E600, utilizado para visualização dos cortes dos dentes.....	93
<i>Figura 32</i> - Objectivas utilizadas, com ampliações de respectivamente 10× (à esquerda), 2× (ao centro) e 4× (à direita).	93
<i>Figura 33</i> - Vista da interface do programa Adobe Photoshop® utilizado para a realização das medições.....	94
<i>Figura 34</i> - Fotografias do dente A1C15 com ampliações de 2, 4 e 10 vezes respectivamente.....	101
<i>Figura 35</i> - Fotografias do dente A1C60 com ampliações de 2, 4 e 10 vezes respectivamente.....	101
<i>Figura 36</i> - Fotografias do dente A1D4 com ampliações de 2, 4 e 10 vezes respectivamente.	102
<i>Figura 37</i> - Fotografias do dente A1D32 com ampliações de 2, 4 e 10 vezes respectivamente.	102
<i>Figura 38</i> - Fotografias do dente A2C10 com ampliações de 2, 4 e 10 vezes respectivamente.....	103
<i>Figura 39</i> - Fotografias do dente A2C17 com ampliações de 2, 4 e 10 vezes respectivamente.....	103
<i>Figura 40</i> - Fotografias do dente A2D2 com ampliações de 2, 4 e 10 vezes respectivamente.	104
<i>Figura 41</i> - Fotografias do dente A2D64 com ampliações de 2, 4 e 10 vezes respectivamente.	104
<i>Figura 42</i> - Fotografias do dente A3C50 com ampliações de 2, 4 e 10 vezes respectivamente.....	105
<i>Figura 43</i> - Fotografias do dente A3C54 com ampliações de 2, 4 e 10 vezes respectivamente.....	105
<i>Figura 44</i> - Fotografias do dente A3D24 com ampliações de 2, 4 e 10 vezes respectivamente.	106
<i>Figura 45</i> - Fotografias do dente A3D57 com ampliações de 2, 4 e 10 vezes respectivamente.	106
<i>Figura 46</i> - Fotografias do dente A4C5 com ampliações de 2 e 4 vezes respectivamente.....	107
<i>Figura 47</i> - Fotografias do dente A4C21 com ampliações de 2, 4 e 10 vezes respectivamente.....	107
<i>Figura 48</i> - Fotografias do dente A4D14 com ampliações de 2, 4 e 10 vezes respectivamente.	108

<i>Figura 49</i> - Fotografias do dente A4D52 com ampliações de 2, 4 e 10 vezes respectivamente.	108
<i>Figura 50</i> - Fotografias do dente B1C30 com ampliações de 2, 4 e 10 vezes respectivamente.	109
<i>Figura 51</i> - Fotografias do dente B2C9 com ampliações de 2, 4 e 10 vezes respectivamente.	109
<i>Figura 52</i> - Fotografias do dente B2D61 com ampliações de 2, 4 e 10 vezes respectivamente.	110
<i>Figura 53</i> - Fotografias do dente B2D62 com ampliações de 2, 4 e 10 vezes respectivamente.	110
<i>Figura 54</i> - Fotografias do dente B3C37 com ampliações de 2, 4 e 10 vezes respectivamente.	111
<i>Figura 55</i> - Fotografias do dente B3D45 com ampliações de 2, 4 e 10 vezes respectivamente.	111
<i>Figura 56</i> - Fotografias do dente B4C29 com ampliações de 2 e 4 vezes respectivamente.	112
<i>Figura 57</i> - Fotografias do dente B4D7 com ampliações de 2, 4 e 10 vezes respectivamente.	112
<i>Figura 58</i> - Fotografias do dente B4D8 com ampliações de 2, 4 e 10 vezes respectivamente.	113
<i>Figura 59</i> - Classificação da fluorose dentária, por H. T. Dean, em 1942	135

ÍNDICE DE GRÁFICOS

<i>Gráfico 1</i> - Representação gráfica dos valores de desmineralização de cada dente pertencente ao grupo de exposição à solução de desmineralização com pH 3,5.....	116
<i>Gráfico 2</i> - Desmineralização média (em unidades arbitrárias) do grupo sujeito à solução de lactato com pH de 3,5, com separação entre exposição contínua e intermitente.....	117
<i>Gráfico 3</i> - Valores relativos ao grupo de exposição contínua, sem o dente A2C10, com média aritmética de 7,9 unidades arbitrárias e desvio padrão de 2,26.	118
<i>Gráfico 4</i> - Valores relativos ao grupo de exposição intermitente, com média aritmética de 8,3 unidades arbitrárias e desvio padrão de 1,9.....	118
<i>Gráfico 5</i> - Representação gráfica dos valores de desmineralização de cada dente pertencente ao grupo de exposição à solução de desmineralização com pH 4,5.....	121
<i>Gráfico 6</i> - Percentagem de peças dentárias que, quando sujeitas à solução de ácido láctico com pH 4,5, apresentaram sinais de desmineralização.....	122

ÍNDICE DE TABELAS

<i>Tabela 1</i> - Sistematização das medidas a tomar para redução da erosão dentária, no que diz respeito os factores extrínsecos e intrínsecos	74
<i>Tabela 2</i> - Sistematização das medidas a tomar para redução do processo de desmineralização, abrangendo maioritariamente três medidas: aumento do fluxo salivar, a conduta a tomar depois de ter existido o contacto ácido e a vantagem de utilização de flúor.....	74
<i>Tabela 3</i> - Aleatorização das peças dentárias em grupos experimentais e grupo controlo.	80
<i>Tabela 4</i> - Códigos atribuídos aos dentes de forma a ser possível a codificação no acrílico de inclusão.	87
<i>Tabela 5</i> - Fotografias dos dentes após serem submetidos às soluções de desmineralização e novamente identificados numericamente, divididos por grupos experimentais e grupo controlo.	99
<i>Tabela 6</i> - Valores obtidos por medição da zona de desmineralização (em unidades arbitrárias) nos dentes correspondentes ao primeiro grupo, de pH 3,5.	113
<i>Tabela 7</i> - Valores obtidos por medição da zona de desmineralização (em unidades arbitrárias) nos dentes correspondentes ao segundo grupo, de pH 4,5.	114
<i>Tabela 8</i> - Valores obtidos por medição da zona de desmineralização (em unidades arbitrárias) nos dentes correspondentes ao terceiro grupo, de pH 5,5.	114
<i>Tabela 9</i> - Valores obtidos por medição da zona de desmineralização (em unidades arbitrárias) nos dentes correspondentes ao quarto grupo, de pH 6,8.	115
<i>Tabela 10</i> - Valores obtidos por medição da zona de desmineralização (em unidades arbitrárias) nos dentes correspondentes ao grupo controlo.	115

Resumo

O objectivo fundamental do trabalho apresentado neste documento consiste em determinar a influência do lactato a nível da cavidade oral e sua participação na desmineralização dentária, quer no que diz respeito lesões de cárie, quer no que diz respeito lesões de erosão dentária. O ácido láctico produzido pelas bactérias cariogénicas, nomeadamente pelo *Streptococcus mutans*, desempenha um papel preponderante no surgimento de lesões cariosas a nível do esmalte. Uma lesão de cárie inicial típica caracteriza-se por um esmalte branco opaco, indicativo de desmineralização activa na sua superfície. Por outro lado e sabendo já que, depois da prática de exercício físico intenso, é segregado ácido láctico para a cavidade oral, sendo que este fica em contacto com os dentes e demais estruturas, equacionamos a hipótese de ele influenciar o surgimento de lesões de erosão dentária.

O trabalho realizado passou pela exposição de dentes terceiros molares a quatro soluções de ácido láctico, com valores de pH distintos (3,5; 4,5; 5,5 e 6,8) e por períodos de tempo diferentes (24 horas, 3 dias, 7 dias e 14 dias). Posteriormente foi medida a profundidade de desmineralização causada por esse contacto, realizado de duas formas distintas: contacto contínuo ou contacto intermitente (intercalado com água purificada).

As principais contribuições do trabalho aqui apresentado são dadas a seguir. Em primeiro lugar, concluímos que são necessários valores de pH da ordem dos 3,5 ou 4,5 para causarem desmineralização visível ao microscópio óptico. Valores de 5,5 ou 6,8 não causam desmineralização alguma. Em segundo lugar, concluímos que parece não haver uma relação directa entre tempo de exposição e profundidade de desmineralização. Em terceiro lugar, não obtivemos diferenças estatisticamente significativas entre exposição contínua e intermitente e, por último, deparámo-nos com padrões de desmineralização completamente diferentes entre dentes sujeitos à mesma solução de desmineralização, nas mesmas condições.

Abstract

The goal of this study consists in determining the influence of lactate in the oral cavity and its role on dental demineralization in the form of dental caries and dental erosion. The lactic acid produced by cariogenic bacteria, namely by the *Streptococcus mutans*, has a very important role on the appearance of carious lesions on the enamel surface. The initial stage caries is typically characterized by a opaque white enamel which indicates active demineralization of the dental surface. On the other hand, and knowing that after intense physical exercise lactic acid is produced in the oral cavity becoming in contact with the teeth and other surrounding structures, we set out the hypothesis that this may influence the appearance of dental erosion lesions.

We exposed third molars to four solutions of lactic acid with distinct pH values (3,5; 4,5; 5,5 and 6,8) during different periods of time (24 hours, 3 days, 7 days and 14 days). After the exposure, we measured the depth caused by the continuous and intermittent contact with the solutions (intercalated with purified water).

Now we present the main contributions of this study. In the first place, we concluded that we need pH values of 3,5 or 4,5 to cause the demineralization necessary to be detected by the optic microscope. The pH values of 5,5 or 6,8 do not cause any kind of demineralization. In the second place, we can say that is not guaranteed a direct relation between demineralization and exposure time. In the third place we can conclude that there are no significant statistical differences between the continuous and the intermittent exposures to the solutions. Finally, we verified the existence of completely different demineralization patterns between teeth that were exposed to the same solution and in the same conditions.

Capítulo I

INTRODUÇÃO

A relação entre produção de lactato e cárie dentária já é amplamente conhecida, desde que se descobriu que a bactéria *Streptococcus mutans*, um dos mais importantes agentes etiológicos da cárie, consegue produzi-lo – não só ácido láctico, mas também acetato, formato e etanol - e desta forma, dar início ao processo de desmineralização do esmalte dentário. As duas características que esta bactéria possui que lhe conferem vantagem no meio intra-oral são a sua acidogenicidade – uma vez que produz ácidos orgânicos como produtos finais do seu metabolismo glicolítico – e a sua capacidade de resistência ao ácido, ou seja, ser capaz de sobreviver em pH's diminutos, aqueles relacionados com a desmineralização do esmalte (Dashper & Reynolds, 2000).

Este ácido láctico bacteriano sofre exocitose através de um processo sem gasto de energia e mediado por transportadores (Carlsson & Hamilton, 1996). Este processo faz com que sejam eliminados os protões responsáveis pela diminuição do pH intracelular, conferindo a estas bactérias um autêntico trunfo de sobrevivência em ambientes de outra forma hostis, como é o ambiente ácido oral, após qualquer refeição.

Interpretando cuidadosamente a curva de Stephan, temos que existe uma relação directa entre o pH da cavidade oral e a ingestão de carboidratos, sendo que é notória uma descida abrupta do pH nos primeiros minutos posteriores à ingestão dos alimentos. Após esta descida nota-se efectivamente uma recuperação (mais gradual) e passados 20 minutos já são atingidos valores de pH semelhantes àqueles detectados no início do processo, isto é, antes da ingestão alimentar.

Por outro lado também é do conhecimento actual que a prática de exercício físico aumenta a formação de ácido láctico e consequentemente de lactato ao nível das células musculares, sendo que este lactato, depois de atingir a circulação sanguínea, é posteriormente excretado na cavidade oral, através das glândulas salivares.

Na cavidade oral este lactato “endógeno” é adicionado ao lactato de produção bacteriana, contribuindo (ou não) para o desenvolvimento das lesões cariosas, uma vez que temos de ponderar a questão da organização bacteriana em biofilmes, a única forma que estas possuem para conseguirem efectivamente lesar as estruturas dentárias.

Mas, em rigor, que quantidade de lactato e que valores de pH são necessários para provocar o surgimento de desmineralização ao nível do esmalte? E haverá alguma diferença se o contacto for feito de forma contínua ou intermitente?

Se o lactato só por si induzir desmineralização dentária, é possível que pessoas que pratiquem desporto de uma forma regular estejam mais sujeitas a lesões de cárie dentária ou lesões de erosão. A distinção entre estas duas entidades clínicas é baseada apenas no facto de haver intervenção ou não de bactérias, sendo que ambas se caracterizam pela desmineralização progressiva das estruturas mineralizadas dos dentes – numa primeira fase o esmalte dentário e numa segunda fase a dentina. Se esta hipótese se confirmar, os atletas deverão ter um acompanhamento rigoroso por parte de um Médico Dentista, que deverá apostar sobretudo na instrução e motivação para a higiene oral destes pacientes, numa perspectiva de prevenir o surgimento e evolução de lesões cariosas; e também estar munido dos conhecimentos que lhe permitam aconselhar o seu paciente a adoptar medidas correctas para prevenção da erosão dentária (estando atento para as diversas causas que esta pode ter, nomeadamente as extrínsecas e as intrínsecas).

Sendo que nos dias que correm existem políticas de combate à obesidade, com estímulo para a prática de exercício físico, nas escolas, desde as idades mais precoces, temos que apostar também no diagnóstico precoce de todos os parâmetros que interferem no desenvolvimento da cárie dentária. De entre estes parâmetros destacamos os hábitos dietéticos, os hábitos de higiene oral e a consciencialização para a importância da mensagem que uma boa saúde oral nos garante um futuro risonho quer em termos estéticos quer também em termos funcionais. No que diz respeito a erosão dentária temos que apostar na educação da população, e promover comportamentos preventivos relacionados com os sumos de fruta natural e com as frutas ácidas, tendo sempre presente o despiste de condições médicas que possam estar associadas, como o refluxo gastroesofágico, a anorexia, a bulimia, entre outros. Cabe-nos a nós, médicos dentistas, fazer o diagnóstico precoce destes casos, interferindo na sua evolução a tempo de interromper o decurso normal da doença.

Capítulo II

OBJECTIVOS

Os objectivos deste trabalho são vários, sendo que o mais abrangente denominámos de geral (é o objectivo maior) e os outros, secundários, apelidámos de específicos, por estarem contidos no geral.

OBJECTIVO GERAL

Qual é o contributo do ácido láctico para a desmineralização dentária, particularmente no que diz respeito ao esmalte?

OBJECTIVOS ESPECÍFICOS

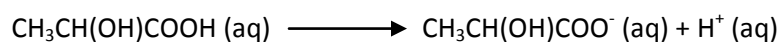
- a) Pode o ácido láctico, quando em actuação solitária, produzir desmineralização no esmalte de dentes hígidos?
- b) Que valores de pH da solução de ácido láctico são necessários para causar lesões de desmineralização?
- c) Há uma relação directa entre tempo de exposição à solução de ácido láctico e profundidade de desmineralização?
- d) A profundidade de desmineralização é uma variável dependente apenas do valor de pH da solução desmineralizadora e do tempo de exposição?
- e) Quais as diferenças entre a exposição contínua das peças dentárias às soluções de ácido láctico e a exposição intermitente das mesmas, para um valor de pH e uma duração de exposição determinados previamente?
- f) As lesões de desmineralização são todas semelhantes, isto é, o padrão de desmineralização é idêntico em todos os dentes?

Capítulo III

REVISÃO DA LITERATURA

Ácido láctico

O ácido láctico (ácido 2-hidroxipropanóico, na designação segundo as regras da IUPAC) é um ácido carboxílico, de fórmula genérica $C_3H_6O_3$, que foi isolado pela primeira vez em 1780 por um químico sueco, de nome Carl Scheele. Quando presente em solução o ácido láctico ($CH_3CH(OH)COOH$), devido ao seu valor de pK_a , comporta-se como um ácido forte e, a um pH fisiológico, rapidamente se dissocia em mais de 99% em aniões lactato ($CH_3CH(OH)COO^-$) e protões H^+ :



Este facto é explicado pela equação de Henderson-Hasselbalch que postula o seguinte:

$$pH = pK_a + \log [A^-]/[HA],$$

sendo que o pH será o inverso do logaritmo dos iões H^+ , HA será o ácido de origem, A^- o anião formado na dissociação do mesmo e o pK_a o inverso do logaritmo do K_a (constante de dissociação de um ácido).

Se substituirmos as variáveis na equação acima referida pelo lactato e pelo ácido láctico a um pH de 7,4 obtemos o seguinte:

$$7,4 = 3,85 + \log [\text{lactato}]/[\text{ácido láctico}],$$

sendo que o K_a é característico do composto em causa e é um valor numérico tabelado.

Da análise desta equação temos que a razão de lactato para ácido láctico a um pH fisiológico de 7,4 é 3548:1, ou seja, existe um claro predomínio de iões lactato comparativamente a moléculas de ácido láctico (Handy, 2006), o que vem de encontro ao comportamento que o ácido láctico adopta de ácido forte, quando em solução, com dissociação praticamente completa (99%, como já foi referido).

O ácido láctico é uma molécula quiral e possui dois isómeros ópticos: o L-ácido láctico ou isómero levógiro (à esquerda na imagem) e o D-ácido láctico ou isómero dextrógiro (à direita na imagem), sendo que aquele que é biologicamente activo é o levógiro (*Figura 1*).

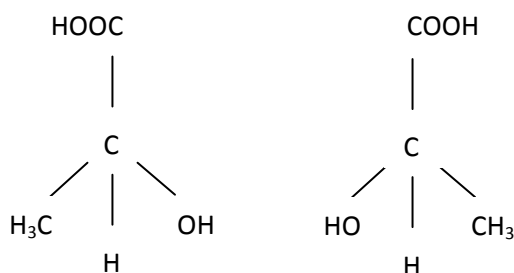


Figura 1 - Isómeros ópticos do ácido láctico, respectivamente o levógiro e o dextrógiro.

1.1 Formação do lactato

O ácido láctico é produzido a partir do ácido pirúvico por acção da enzima desidrogenase láctica (LDH). O ácido pirúvico é formado através do processo da glicólise, onde há a “quebra” da molécula de glicólise para formar duas moléculas de ácido pirúvico. Neste processo constituído por dez passos distintos estão envolvidas várias enzimas diferentes, que catalizam as várias passagens (Figura 2) (Handy, 2006).

A equação que resume estas reacções é:

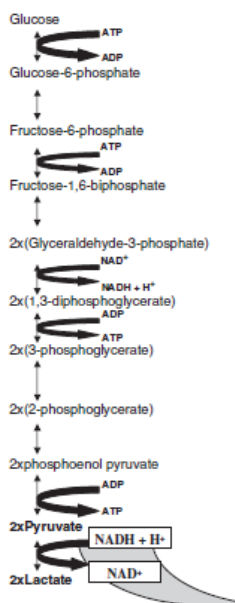
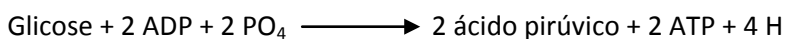


Figura 2 - Formação de piruvato e lactato a partir da glucose.

Como resultado deste conjunto de reacções químicas temos a formação de duas moléculas de ácido pirúvico juntamente com um ganho de duas moléculas de ATP (uma vez que são efectivamente formadas quatro moléculas de ATP, mas duas delas são dispendidas na fosforilação da glicose original para formação da frutose-1,6-difosfato) e também quatro átomos de hidrogénio. Estes átomos de hidrogénio vão posteriormente combinar-se com o NAD^+ , que por acção da enzima desidrogenase formam $\text{NADH} + \text{H}^+$. Quando um ou os dois produtos finais destes processos começam a estar presentes em quantidades excessivas, reagem entre si dando origem então ao ácido láctico, numa reacção que pode ser traduzida da seguinte forma (Figura 3) (Handy, 2006):

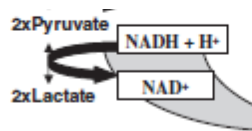
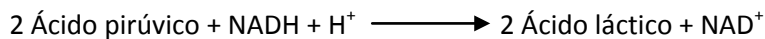
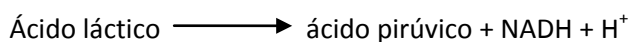


Figura 3 - Pormenor da conversão de piruvato em lactato.

Esta reacção é catalizada pela enzima desidrogenase láctica (LDH). O ácido láctico funciona portanto como uma “fuga” que permite que os produtos glicolíticos possam desaparecer, permitindo dessa forma que o processo tenha continuidade.

A conversão de ácido pirúvico a ácido láctico pode ser revertida, e se as condições forem favoráveis, pode verificar-se a reacção inversa:



Esta conversão pode efectivamente ocorrer sob algumas condições (Handy, 2006):

- na ausência de mitocôndrias (no caso particular dos eritrócitos);
- quando há uma diminuição na disponibilidade de oxigénio levando à acumulação de piruvato;
- no caso de um aumento rápido na taxa metabólica, ou seja, quando a síntese de piruvato excede a sua utilização pela mitocôndria (havendo portanto uma acumulação de lactato a nível celular);

- se o metabolismo da glicose for superior à capacidade oxidativa da mitocôndria (como acontece nos recém-nascidos ou durante a administração de catecolaminas).

1.2 O lactato é um metabolito anaeróbio? (limiar anaeróbio)

Antigamente havia a opinião generalizada que condições de anóxia e hipóxia estimulavam a produção de ácido láctico pelas células musculares. Esta opinião baseava-se em estudos em animais submetidos a condições de privação de oxigénio e mensuração posterior dos níveis de lactato acumulados nos tecidos.

Hoje em dia não há dúvida que em condições de privação de oxigénio há realmente produção de lactato. A questão é colocada ao contrário, ou seja, se a produção e a acumulação de grandes quantidades de lactato necessariamente implicam a submissão do indivíduo a condições de ausência ou limitação de oxigénio.

É nesta base que surge o conceito de limiar anaeróbio (Wasserman, 1984), cujo paradigma acenta na questão de que a produção e concentração elevadas de ácido láctico durante a contracção muscular ou exercício físico são o resultado da fosforilação oxidativa limitada pelo oxigénio.

Durante os últimos 35 anos tem-se investigado muito aprofundadamente esta questão, tentando perceber-se a real influência do oxigénio na etiologia da produção e acumulação de lactato a nível tecidual. De acordo com o estado da arte do momento, acredita-se que o oxigénio é apenas um dos vários factores que interactivam levando ao aumento na concentração de lactato muscular e sanguínea no caso de exercício submáximo.

É um facto que o lactato está sempre presente no sangue, músculos e outros tecidos e que a sua produção ocorre no músculo esquelético em contracção e em condições aeróbias puras, ou seja, com disponibilidade total de O₂ (Brooks et al., 1999).

Assim sendo, levantam-se duas questões:

- Será então o lactato um metabolito anaeróbio?

- Quais os outros factores que actuam na acumulação de lactato aquando da realização de exercício físico?

Na resposta à primeira, responderíamos que sim, é um metabolito anaeróbio se as condições forem de anóxia. Mas ressaltaríamos outras condições possíveis... Será um metabolito hipóxico na presença de disóxia e será um metabolito aeróbio na presença de quantidades de oxigénio adequadas. Concluimos portanto que longe vai a caracterização de uma forma redutora do lactato como metabolito exclusivamente anaeróbio; ele é antes um composto que adopta vários comportamentos consoante as condições gerais.

Na resposta à segunda, Gladden (2004) sumariza estas causas num quadro, em que basicamente as divide em quatro grupos:

- i. O metabolismo dependente do O_2 - a diminuição da PO_2 leva a um aumento do NADH e ATP que por sua vez leva a um aumento do lactato para satisfazer as necessidades musculares e compensar a diminuição da PO_2 . Este aumento de lactato é um estímulo para o processo da glicólise.
- ii. A glicólise mais rápida que acontece aquando da realização de exercício físico intenso.
- iii. A remoção do lactato – o exercício físico estimula a actividade simpaticoadrenérgica, sendo que a adrenalina diminui a remoção do lactato pelos músculos. Além disso causa vasoconstrição e portanto diminui a irrigação sanguínea ao fígado, rim e músculos não activos, o que leva à diminuição da oxidação do lactato e também à diminuição da sua remoção.
- iv. Recrutamento de fibras musculares rápidas – à medida que o exercício se torna mais intenso, o organismo activa mais fibras rápidas. Estas fibras são mais propensas à produção de lactato.

Se atentarmos bem nos quatro argumentos apresentados por Gladden (2004) concluimos que durante a prática de exercício físico intenso tanto há um aumento da produção de lactato, como a sua remoção se encontra diminuída. Ambos os argumentos nos conduzem à justificação da maior acumulação de lactato nos tecidos com a prática de exercício físico.

Em 2002 Grant e colaboradores demonstraram em experimentação animal (com ratos) que a hipóxia crónica tinha um efeito específico dependendo do tecido a que nos estávamos a referir, quer em termos de MCT's quer em termos de LDH, mas não produzia um aumento

consistente nestes componentes na totalidade dos tecidos sujeitos a experimentação (músculo esquelético, músculo cardíaco e fígado).

Juel e colaboradores em 2003 realizaram um estudo comparativo acerca das alterações em indivíduos nativos, habituados a viver em altas altitudes (4100 metros) – sujeitos a condições ambientais de hipóxia - e indivíduos que viviam ao nível do mar, com o intuito de constatar quais as alterações observadas, em termos de expressão de proteínas transportadoras, enzimas envolvidas e fluxos de H^+ e de HCO_3^- . Depois de comparar os dois grupos de indivíduos, chegaram à conclusão que a hipóxia crónica induz alterações importantes nas proteínas dos eritrócitos, mas apenas alterações moderadas nas proteínas musculares envolvidas no controlo ácido-base.

No conjunto das conclusões podemos afirmar que a hipóxia induzida parece aumentar a capacidade do lactato, do HCO_3^- e do H^+ fluírem do tecido muscular para o sangue e do sangue para o interior dos eritrócitos.

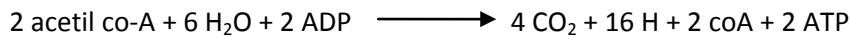
1.3 Lactato e fadiga muscular

Antigamente pensava-se que o lactato era o causador da fadiga muscular, ideia que perdurou até há pouco tempo atrás. Depois disso, investigadores de renome começaram a argumentar que os prótons (H^+) provenientes da dissociação do lactato seriam mais lesivos do que propriamente o anião lactato. Posteriormente, Nielsen e seus colaboradores (2001) fizeram um estudo em que comprovam que, na realidade, a acidose láctica protegia a célula dos efeitos perjurativos do aumento da concentração de K^+ (proveniente da activação da bomba de Na^+/K^+ secundária ao aumento de Na^+ intracelular). No ano seguinte (2002) Westerblad e colaboradores apontam para um caminho alternativo a todos os outros que tinham sido equacionados até então: o fosfato inorgânico (Pi) é que seria o causador da fadiga muscular.

No entanto, Fitts em 2003 chama a atenção para a prematuridade de descartar o contributo do H^+ em todo este processo, defendendo que mais estudos necessitam de ser feitos para que os papéis de todos estes elementos sejam esclarecidos.

1.4 Oxidação e metabolização do lactato

Depois da conversão do ácido láctico a ácido pirúvico, este pode seguir três destinos metabólicos: ou entra na mitocôndria e produz energia; ou é convertido em glicose através do processo de gluconeogénese ou ainda pode sofrer transaminação e dar origem a alanina. Quando acontece ser convertido em acetil coenzima A, que posteriormente entra no ciclo de Krebs, no qual a porção acetil da acetilcoenzima A é degradada em CO₂ e átomos de hidrogénio, dá-se o processo que é descrito na reacção que se segue



Enquanto a primeira alternativa pode ocorrer em qualquer tipo de tecido que possua mitocôndrias, as duas outras possibilidades só têm hipótese de acontecer em tecidos com os sistemas enzimáticos apropriados, como é o caso do fígado e dos rins. Em todos os outros tecidos biológicos estas alternativas são não exequíveis.

Esquemáticamente podemos prestar atenção no esquema que se segue (*Figura 4*), onde estão presentes todas as entidades referidas (Handy, 2006):

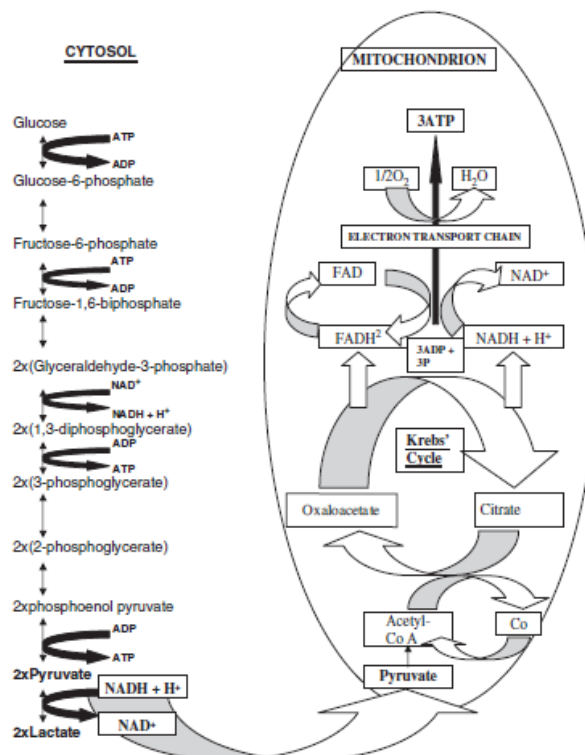


Figura 4 - Processo glicolítico e ciclo de Krebs.

O destino major do lactato captado pelo tecido muscular parece ser então a oxidação, uma vez que já desde 1970 Jorfeldt demonstrou que durante o exercício físico 50% do lactato marcado com ^{14}C podia ser posteriormente detectado como CO_2 também marcado. No entanto, e perante vários outros estudos levados a cabo dentro desta temática, parece ser verdade que quer em repouso quer durante a realização de exercício físico algum lactato captado pelos músculos não é oxidado, mas sim metabolizado em outros metabolitos, como é o caso da incorporação quer no glicogéneo, quer no aminoácido alanina. Segundo McDermott & Bonen (1992), este contributo do lactato para a produção destes metabolitos não deve ser superior a 10% do total, sendo a excepção o caso de altas concentrações musculares de lactato (onde haverá uma maior tendência para haver esta metabolização, complementar à oxidação).

1.4.1 Shuttle intercelular

Na dinâmica de produção e metabolização de ácido láctico temos portanto que atentar no papel preponderante que assume o tecido muscular esquelético. Desde 1985 que Brooks identifica um “lactate shuttle”, intercelular. Este shuttle é responsável pela passagem de lactato de umas fibras musculares para as vizinhas, desde que estas se encontrem nas proximidades umas das outras.

Para desempenhar o seu papel nos diversos sistemas em que actua, o lactato tem que ser transportado através das membranas celulares, uma vez que em condições de pH fisiológico o lactato existe na sua forma aniónica e, neste estado carregado, não consegue passar através das mesmas membranas por difusão simples.

Este shuttle intercelular é, desta forma, o meio primordial através do qual o metabolismo intermédio nos diversos tecidos é coordenado (Dubouchaud et al., 2000).

1.4.2 MCT's

Como já foi referido, são necessários transportadores para o lactato, uma vez que este não consegue atravessar a membrana plasmática por difusão simples, visto que se apresenta na sua forma aniónica, carregada negativamente.

O primeiro transportador monocarboxilado a ser sequenciado foi o MCT1, a partir de eritrócitos, visto que grandes quantidades destas células conseguem ser obtidas com facilidade. Depois desta descoberta desconfiou-se que não haveria apenas um tipo destes transportadores, mas sim uma família, facto esse que foi confirmado pela clonagem e sequenciação do MCT2, uma segunda isoforma de MCT, com 60% de semelhança ao MCT1. O seguinte a ser descoberto foi o MCT3, sequenciado a partir do epitélio da retina de uma galinha, apresentando 43% de semelhança com o MCT1 e 45% com o MCT2. Depois da descoberta do MCT3 foram sequenciados mais 4 membros desta família – do MCT4 ao MCT7, que possuem entre 30 e 60% de afinidade com o MCT1. Outra sequência relacionada com os MCT foi identificada como sendo codificada no interior da sequência do cromossoma X humano e foi denominada de MCT8 (Juel & Halestrap, 1999).

As características comuns a todos os membros da família dos MCT's são a existência de 12 domínios transmembranares com o terminal –N e o terminal –C ambos intracelulares e um grande *loop* intracelular entre os segmentos 6 e 7. Foi sugerido que as duas metades da molécula (domínios transmembranares 1-6 e 7-12) desempenhem diferentes funções: os domínios mais próximos do terminal –N (1-6) parecem ser mais importantes para a ligação energética (por exemplo via cotransporte com o Na^+ ou o H^+), para a inserção membranar ou para a manutenção da estrutura correcta; enquanto que os domínios mais próximos do terminal –C (7-12) parecem ser mais importantes para a determinação da especificidade do substrato (Juel & Halestrap, 1999).

Além destas características também é verdade que todos os MCT's medeiam o transporte membranar com uma ligação obrigatória de 1:1, isto é, de uma molécula de lactato para um ião H^+ . Por esta razão desempenham um papel importante na regulação do pH celular (Juel, 2001).

Outra característica interessante é que os transportadores ditos comuns direccionam o substrato numa direcção apenas, enquanto que o que se constata no caso do transporte de lactato e protões H^+ é que a direcção do transporte está dependente do gradiente de concentração dos substratos.

Nunca foi provado que qualquer das isoformas dos MCT's conhecidas seja capaz de transportar selectivamente o lactato numa direcção apenas (Juel, 2001).

1.4.3 Fibras musculares e lactato

Durante a realização de exercício físico estão envolvidos dois tipos de fibras musculares: as fibras glicolíticas, que fazem parte dos músculos brancos e que produzem lactato (e que expressariam o receptor MCT4, que seria responsável pelo efluxo de lactato para o exterior da célula) e as fibras musculares oxidativas (que fazem parte dos músculos vermelhos), muito ricas em mitocôndrias e mioglobina e que, por realizarem o processo de respiração oxidativa, consomem lactato (portanto expressarão o receptor MCT1, responsável pelo transporte de lactato para o interior das fibras musculares. (Wilson et al., 1998; Juel & Halestrap, 1999)). Estes dados sugerem que a expressão do MCT1 nas fibras musculares poderá reflectir de alguma forma a quantidade de lactato que é requerida transportar para o interior celular, para que seja oxidado e utilizado como partícula energética. A presença de altas quantidades do transportador MCT1 no tecido muscular cardíaco é consistente com este ponto de vista (Halestrap et al., 1997).

A captação de lactato pelos músculos estará aumentada com o exercício físico (quando comparado com situações de repouso) e sofrerá também um aumento com a intensidade desse mesmo exercício (G Van Hall, 2000).

No entanto, não podemos afirmar que os receptores tenham papéis distintos, isto é, que o MCT1 desempenhe exclusivamente a função de entrada do ácido láctico na célula muscular e que o MCT4 seja o único responsável pela saída do mesmo ácido láctico para o exterior celular. Sabemos que o MCT4 tem uma menor afinidade para o lactato quando comparado com o MCT1 (K_m do MCT4 é de 20mM e K_m do MCT1 de 5mM). Há extensa evidência científica que prova que as diferentes isoformas dos MCT podem realizar o transporte em ambas as direcções, sendo que este está dependente dos valores de K_m e de $V_{máx}$ para as proteínas transportadoras.

A certeza que temos no momento é que das 8 isoformas de MCT's já caracterizados todas exibem especificidades de domínios celulares, assim como diferenças de distribuição inter-espécie. As isoformas MCT1 e MCT4 foram encontradas em abundância em homogeneizados de músculo estriado (Brooks et al., 1999, Juel & Halestrap, 1999) e as isoformas MCT1 e MCT2 no cérebro de rato (Pellerin et al., 1998). Nos peroxissomas do fígado de rato existem MCT1 e MCT2, assim como uma desidrogenase láctica peroxissomal (pLDH), que juntos formam um "lactate shuttle" presente nos peroxissomas (McClelland et al., 2003) e na retina encontram-se MCT3 (Yoon et al., 1997).

Van Hall (2000) defende que o destino dado ao lactato captado pelas fibras musculares depende em grande parte do tipo de fibra muscular em causa e coloca a tónica no facto de as fibras musculares tipo II produzirem lactato e as fibras musculares tipo I consumirem esse mesmo lactato. Como sabemos na actualidade, a actividade da LDH e as suas isoenzimas são diferentes nas fibras tipo I e tipo II, facto esse que pode justificar esta diferença.

Gladden (2004) defende que haverá lactato que entrará na corrente sanguínea, assim como algum será difundido para as fibras musculares oxidativas vizinhas que captam o lactato e o oxidam. A corrente sanguínea será o elo de ligação entre os determinados tecidos envolvidos neste shuttle de lactato.

Durante a prática de exercício físico, o lactato é produzido nas fibras musculares glicolíticas, que ao realizarem o processo de glicólise formam ácido pirúvico, que posteriormente é convertido em ácido láctico. Este ácido láctico, por se encontrar em solução, rapidamente se dissocia em lactato e H^+ , sendo que o lactato é expulso da célula muscular através dos transportadores MCT1 e MCT4 (Juel, 2001; Butz et al., 2004), sendo transportado para o fluido intersticial. Nesta fase do processo temos que considerar o sarcolema como uma barreira à passagem do lactato. Ao contrário do que era pensado antigamente, o lactato não difunde simplesmente através desta membrana, mas possui proteínas transportadoras, proteínas estas que além de transportarem lactato, também transportam piruvato, acetoacetato e acetato. Uma vez presentes no fluido intersticial quer o anião La^- quer o protão H^+ têm acesso à corrente sanguínea, quer através das fendas endoteliais, quer possivelmente através das próprias células endoteliais (Gladden, 2004).

É de referir que a parede do capilar normalmente não é considerada uma barreira à passagem do lactato, embora em rigor não se conheça que fracção difunde para a fenda endotelial e que fracção é captada pelas células endoteliais e libertada do outro lado (Van Hall, 2000). Vindo do fluido intersticial, o lactato entra no plasma sanguíneo através de um cotransporte com o H^+ e daí entra nos eritrócitos através do transportador MCT1, presente nas suas membranas (Halestrap & Price, 1999). À medida que o sangue circula pelo organismo, o circuito é revertido com o lactato a sair dos glóbulos vermelhos para o plasma e daí para o fluido intersticial e para as células dos vários órgãos, a favor do gradiente de concentração. Esquemáticamente (*Figura 5*) podemos dizer que:

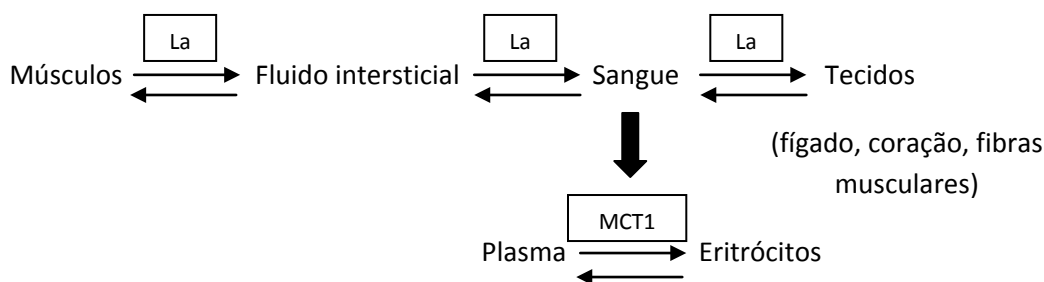


Figura 5 - Circuito percorrido pelo lactato, sendo que todos os passos são reversíveis.

1.4.4 Shuttle intracelular

Brooks em 1998 e mais tarde em 1999 defende a existência de um “lactate shuttle” intracelular. O facto base em que acenta toda esta teoria é que o lactato é, efectivamente, um produto inevitável do processo de glicólise, uma vez que a enzima LDH tem o valor mais elevado de V_{\max} comparativamente com qualquer outra enzima participante em todo o processo e que o K_{eq} do piruvato para lactato está definitivamente deslocado na direcção do lactato.



Segundo esta teoria, haverá captação directa e oxidação do lactato pela mitocôndria isolada sem ser necessária a conversão extramitocondrial de lactato para piruvato, haverá também a presença de LDH intramitocondrial e haverá ainda um transportador de lactato MCT1 na mitocôndria, presumivelmente na sua membrana interna (Gladden, 2001; McClelland et al., 2003). Embora esta opinião seja a que perdura, devemos ter em atenção que em 2002 Rasmussen e colaboradores publicam um artigo onde concluem que as mitocôndrias do músculo esquelético quer humano, quer de rato, são desprovidas de LDH e incapazes de metabolizar lactato.

O processo seria então o seguinte (Gladden, 2001): o ácido láctico seria produzido de forma contínua no citosol, sendo que o ritmo de produção seria aumentado com o aumento do processo glicolítico. O lactato então em excesso no citosol seria difundido para a mitocôndria onde seria transportado através da sua membrana interna pelo MCT1. Uma vez no interior da mitocôndria, na matriz mitocondrial, a LDH presente catalisaria a conversão de lactato outra vez a piruvato, que poderia ser oxidado a acetil-coA. Esta acetil-coA continuaria o seu caminho para o ciclo de Krebs.

Já em 1999 Brooks e seus colaboradores fizeram estudos para determinar qual era o papel da LDH mitocondrial no efluxo do lactato tecidual e na sua oxidação *in situ* e se o transportador MCT1 poderia efectivamente ser o transportador mitocondrial lactato/piruvato. Os resultados destes estudos foram a conclusão que o lactato é, em rigor, o monocarboxilato predominantemente oxidado pelas mitocôndrias *in vivo* e que as mitocôndrias do músculo estriado conseguem efectivamente oxidar lactato exógeno, uma vez que existe um *pool* de LDH interno que facilita a oxidação do lactato (Brooks et al., 1999). Do outro estudo concluiu-se que a presença de MCT1 nas mitocôndrias do músculo estriado permite a oxidação mitocondrial do lactato e facilita a função do já referido “intracelular shuttle” (Brooks et al., 1999). Em 2004 Butz e colaboradores e em 2006 Hashimoto e colaboradores vêm confirmar que efectivamente a isoforma 1 dos transportadores monocarboxilatos é o transportador de lactato/piruvato na membrana interna das mitocôndrias.

Resumindo, este shuttle intracelular seria responsável pelo facto de o lactato produzido a nível dos miócitos e dos hepatócitos poder ser transportado para e oxidado pelas mitocôndrias dessas mesmas células. Para isso acontecer, teria que estar disponível a enzima desidrogenase láctica (LDH), com o objectivo de desempenhar o seu papel: ser o transportador piruvato/lactato (Dubouchaud et al., 2000).

1.4.5 Remoção do lactato

É importante reflectir um pouco acerca da remoção do lactato do organismo, após a sua síntese. É consensual que a recuperação deve ser feita à base de exercícios aeróbios com cargas leves, uma vez que as cargas pesadas aumentam o fluxo sanguíneo para o coração e músculos esqueléticos e diminuem o fluxo esplénico que vai comprometer a remoção do lactato em circulação.

Ribeiro & Tourinho em 2002 levaram a cabo um estudo com o objectivo de analisar o efeito da utilização de velocidades moderadas de corrida em passadeira rolante, durante a recuperação activa, após um exercício de intensidade supramáxima. Relacionaram este facto com a taxa de remoção do lactato sanguíneo. Estes investigadores verificaram que o lactato pode efectivamente ser removido do sangue e dos músculos mais rapidamente após um exercício intenso a máximo recorrendo a um exercício leve, em vez de o sujeito ficar simplesmente em repouso. Do estudo em questão concluíram que apesar de não ter sido

possível detectar diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos de recuperação, pode observar-se uma tendência de maior eficácia na remoção do lactato se se realizar a recuperação activa na intensidade correspondente a 35% do VO_2 máximo. A 35% do VO_2 máximo os indivíduos removem 0,11 mmol/L de lactato por minuto, a 50% do VO_2 máximo removem 0,07 mmol/L e a 65% do VO_2 máximo removem apenas 0,05 mmol/L de lactato por minuto (correspondendo a sensivelmente metade da taxa de remoção a 35% do VO_2 máximo).

1.5 Regulação do pH: Sistemas tampão

A regulação do pH intracelular é uma questão que assume particular importância se pensarmos na complexidade enzimática / metabólica de todos estes processos. Estas potenciais alterações de pH podem modificar a conformação das proteínas, alterar as propriedades dos canais e deprimir a actividade de enzimas-chave na glicólise, que reduzem consequentemente a taxa de ressíntese de ATP (Messonnier et al., 2007).

Durante os períodos de actividade muscular intensa, como já referimos, há produção de protões e de lactato a nível das células musculares. De qualquer forma temos que ter presente que o anião lactato é um anião forte (juntamente com o anião cloro), mas não é o único factor determinante do pH intracelular. Devemos considerar o balanço entre protões como o Na^+ , o K^+ e o Ca^{2+} e os aniões Cl^- e La^- (Gladden, 2004). Estes produtos metabólicos podem seguir duas vias distintas: ou serem tamponados e removidos intracelularmente ou serem libertados para o interstício.

Podemos dizer que os mecanismos que a célula possui para realizar o tamponamento dos protões e fazer a expulsão do lactato representam a primeira linha de defesa contra a acidose e a acumulação de lactato (Messonnier et al., 2007). O facto de o transportador MCT1 estar presente na membrana da mitocôndria (Hashimoto et al., 2006) permite que quer o lactato quer os protões H^+ entrem na mitocôndria. Este facto só por si vai fazer com que haja um espaço de “diluição” e que haja um atraso quer na acumulação de lactato, quer na diminuição crítica do pH intracelular. Considerando as coisas desta forma podemos ver a própria mitocôndria como um participante activo nos mecanismos tampão. Outro argumento a favor deste ponto de vista será a existência de um complexo de oxidação de lactato no próprio interior mitocondrial.

Os demais sistemas tampão também assumem a sua importância no controlo do pH. Se atentarmos no conjunto de processos que ocorrem nas fibras musculares observamos que há três pontos (Cerretelli & Samaja, 2003) que nos devem suscitar alguma reflexão:

- o processo de glicólise aeróbia gera, como já foi explicado, quantidades importantes quer de lactato quer de H^+ ;
- a hidrólise da fosfocreatina consome prótons;
- o processo de glicólise anaeróbia é responsável pelo acumular de grandes quantidades de lactato.

Estas realidades no seu conjunto requerem a existência de sistemas tampão eficazes no controlo do pH.

Em situações de repouso, o que acontece é que as fibras musculares têm um pH relativamente alcalino – entre 7,10 e 7,15 (Kayser et al., 1993), valor esse que é o resultado do balanço da produção de ácidos pelo metabolismo celular normal e a entrada passiva de iões H^+ por um lado e as bombas Na^+/H^+ e HCO_3^-/Cl^- por outro.

Aquando da realização de exercício físico sabemos que há uma descida acentuada do pH, que pode atingir valores de 6,7 (Kayser et al., 1993). Durante o exercício moderado o mecanismo prevalente para a regulação do pH é a troca através da bomba Na^+/H^+ , enquanto que durante o exercício supra-máximo a regulação já é feita maioritariamente pelo cotransporte de lactato/ H^+ (Figura 6).

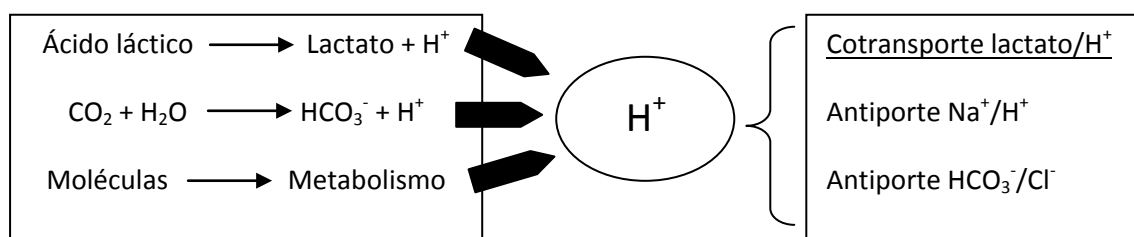


Figura 6 - Mecanismos de regulação do pH.

Este cotransporte de lactato/ H^+ é mediado maioritariamente pelos transportadores MCT1 e MCT4 (Juel, 2006) e é o principal sistema accionado para protecção do ambiente intracelular. Juel em 2001 afirmou que o cotransporte lactato/ H^+ é o mecanismo de transporte responsável pela remoção das maiores quantidades de H^+ das células musculares, assumindo

assim uma importância major na regulação do pH. O efluxo de prótons é depois completado pelo sistema de troca Na^+/H^+ (NHE1), que assume menor importância, sobretudo aquando da realização de exercício físico. Partindo destas premissas, podemos afirmar que a capacidade muscular durante a prática de exercício físico depende do conteúdo de MCT1, MCT4 e NHE1 desse mesmo músculo (Messonnier et al., 2007). Outra questão da qual não nos podemos esquecer é que quer a troca Na^+/H^+ quer o cotransporte de $\text{Na}^+/\text{bicarbonato}$ medeiam um influxo de Na^+ para o interior da célula. É provável que esta entrada de Na^+ durante os mecanismos de regulação do pH seja suficiente para estimular a bomba Na^+/K^+ (Kristensen et al., 2004). Uma vez que existe uma relação directa entre a actividade desta bomba e o potencial de membrana podemos inferir que pode haver desta forma alterações que afectem a excitabilidade muscular.

A bomba Na^+/K^+ também desempenha o seu papel na regulação do pH, contudo, suspeita-se que a activação desta bomba possa ser insuficiente ou que a capacidade da mesma possa ser limitada, uma vez que é sabido que o K^+ tem tendência a acumular-se extracelularmente e o Na^+ , pelo contrário, tem tendência a acumular-se intracelularmente, durante a actividade muscular (Juel et al., 2000).

Nielsen e colaboradores em 2002 provaram a existência de outros canais que envolvem o ião potássio, que precisamos considerar. Os canais de potássio dependentes do ATP (K_{ATP}) estão localizados maioritariamente na membrana plasmática das células musculares e parecem estar presentes em todos os tipos de fibras. Estes canais são importantes uma vez que entram no balanço que obrigatoriamente temos que fazer entre o K^+ libertado pelos vários canais membranares (dependentes da voltagem e associados aos potenciais de acção) e a sua recaptação mediada pela bomba Na^+/K^+ . Estes canais desempenham um papel preponderante na concentração de potássio no espaço intersticial.

Street e seus colaboradores em 2001 levaram a cabo um estudo no qual fizeram a medição contínua das alterações do pH intersticial aquando da realização de exercício físico. Obtiveram o valor de $7,38 \pm 0,02$ para pH médio do interstício em repouso e concluíram que o valor do pH intersticial apresentava um decréscimo directamente proporcional à intensidade do exercício. Pensa-se que a acidificação diferencial do interstício quando comparado com o sangue, acontece porque o interstício possui uma menor capacidade de tamponamento, uma vez que é detentor de apenas cerca de metade da concentração proteica.

Pensando agora na parte extracelular, temos que a alta concentração de HCO_3^- no espaço intersticial é o mecanismo major de protecção celular. A anidrase carbónica que acelera a reacção entre CO_2 , HCO_3^- e H^+ é mandatória para tornar o processo suficientemente rápido para ser exequível in vivo. Há duas isoformas da anidrase carbónica que participam neste processo: a CA IV e a CA XIV. Estas enzimas, juntamente com o sarcolema são imprescindíveis para a manutenção de um pH intersticial normal (*Figura 7*).

<u>pH intracelular</u>	<u>pH extracelular</u>
<ul style="list-style-type: none"> • Mitocôndria (MCT1 e complexo de oxidação) • Cotransporte de lactato/H^+ • Bomba Na^+/H^+ • Cotransporte $\text{Na}^+/\text{bicarbonato}$ 	<ul style="list-style-type: none"> • CA associada ao sarcolema

Figura 7 - Factores associados ao controlo do pH intra e extracelular

Apesar da existência dos mecanismos protectores acima mencionados, sabemos que o exercício máximo produz protões e moléculas de lactato a um ritmo muito superior ao que a célula consegue tamponar ou metabolizar. Como resultado deste facto temos que, como já foi referido anteriormente, verifica-se uma descida do valor de pH que pode atingir os 6,4 na célula muscular e os 6,94 no sangue (Hermansen & Osnes, 1972).

Quando os músculos são estimulados até à fadiga, quer o lactato quer os iões H^+ sofrem uma acumulação intracelularmente resultando na tal diminuição do pH intracelular. Simultaneamente ocorre a diminuição do pH intersticial, mas num grau muito menor (Kristensen et al., 2005). É de salientar então a maior importância destas repercussões a um nível intracelular, em detrimento do extracelular.

2. Saliva

A saliva é um composto aquoso produzido pelas glândulas salivares: a parótida – glândula puramente serosa, uma vez que não segrega mucina; a sublingual – glândula maioritariamente mucosa e a submandibular - glândula mista sero-mucosa. Além destas glândulas major, há outras, as glândulas salivares minor, que são maioritariamente glândulas de Von Ebner (órgãos puramente serosos localizados no tecido conjuntivo debaixo das papilas circunvaladas) e glândulas mucosas de Blandin-Nühm (Chiappin et al., 2007). Para a saliva total ainda contribuem pequenas quantidades de outros fluidos (como seja o fluido crevicular) e outros produtos da mucosa oral (Proctor & Carpenter, 2007).

A saliva desempenha várias funções importantes para o organismo, sendo que as mais relevantes serão:

- auxiliar a formação do bolo alimentar, uma vez que serve de factor de união para as partículas alimentares;
- proteger a mucosa oral de agressões de índole mecânica;
- permitir a digestão primária de alguns alimentos, por conter α -amilase e outras enzimas;
- facilitar a percepção do sabor dos alimentos uma vez que permite que as partículas alimentares entrem em contacto com as papilas gustativas;
- fazer o tamponamento dos componentes ácidos dos alimentos – com relevância para a função desempenhada pelo tampão bicarbonato;
- manter o processo de mineralização do esmalte – a saliva é um reservatório super saturado de biominais, como o cálcio, o fosfato e o flúor, que continuamente circundam o dente e desta forma participam na sua mineralização;
- ajudar na dicção;
- desempenhar um papel preponderante no sistema imunitário específico (imunoglobulinas) e não-específico (lisozima, peroxidase, cistatinas, lactoferrina e outras).

As funções que desempenha a saliva são tão importantes que a hipofunção crónica salivar pode despoletar problemas de saúde sérios, como o sejam as dificuldades de

deglutição, alterações do paladar, o surgimento de cárie dentária, doença periodontal e candidíase oral, problemas de má-nutrição, entre outros (Wang et al., 2009).

As glândulas salivares são glândulas exócrinas formadas por estruturas tubulo-alveolares, com duas regiões distintas: os ácinos e os ductos. As células acinares representam 80% da massa da glândula e são as responsáveis pela formação do fluido salivar e pela maior parte da secreção proteica. Os ductos são um sistema de ramificações que transportam o fluido produzido nos ácinos para o interior da cavidade oral. Os ductos podem ser intercalados, estriados e secretores sendo que os intercalados estão localizados mais próximo do ácino, os estriados são intermédios e os secretores são aqueles localizados numa posição mais próxima dos canais excretores. Os ductos estriados são assim denominados uma vez que possuem grandes quantidades de mitocôndrias localizadas na porção basolateral das células, conferindo-lhes o aspecto de estrias (Proctor & Carpenter, 2007).

A rodear as unidades secretoras finais e os ductos intercalados encontram-se células mioepiteliais que ajudam na saída da saliva, promovendo o fluxo salivar (Nauntofte et al., 2005). As células acinares são permeáveis à água, sendo que as células ductais, por outro lado, são impermeáveis. As células acinares estão unidas por *tight junctions* (Baum, 1993), que permitem a passagem de algumas moléculas para o interior do ácino, sendo que a passagem não é “livre”, isto é, é condicionada por alguns factores, como o seja o tamanho da molécula.

A produção salivar de um indivíduo adulto e saudável é cerca de 500 – 1500 ml por dia, quantidade esta que pode ser alterada por diversos factores condicionantes, como sejam os estímulos olfactivos e gustativos, a própria mastigação, o estado hormonal e psicológico do indivíduo, fármacos que este esteja a tomar, a sua idade, factores hereditários e o estado de higiene oral.

A saliva é produzida a partir do plasma sanguíneo, sendo que normalmente se apelida de um ultrafiltrado plasmático e a sua composição e fluxo dependem maioritariamente da actividade do sistema nervoso autónomo: simpático e parassimpático.

Fazendo a sistematização das ideias de uma forma esquemática podemos dizer que a estimulação do sistema nervoso parassimpático (mediado pelo neurotransmissor acetilcolina, através dos seus receptores muscarínicos) será responsável pela exocitose de mucina pelas glândulas mucosas, pela indução da contracção das células mioepiteliais e pelo aumento do fluxo sanguíneo glandular (como parte do reflexo salivar). A estimulação do sistema nervoso

simpático faz-se através da noradrenalina e produz muito pouco efeito a nível de secreção mucosa. De forma semelhante ao sistema nervoso parassimpático induz a contracção das células mioepiteliais e pode modular o fluxo salivar, mas não actua como parte integrante do acto reflexo (Proctor & Carpenter, 2007).

Além das características já apresentadas, a estimulação do sistema simpático altera a quantidade, viscosidade e concentração iónica e proteica da saliva; a estimulação do sistema parassimpático estimula a produção e secreção de grandes quantidades de saliva, sendo esta saliva constituída por quantidades reduzidas de compostos orgânicos e inorgânicos.

2.1 Processo de formação da saliva a partir do sangue

Já foi referido que a saliva é formada nas glândulas salivares, por um processo de *clearance* de compostos do plasma. As glândulas salivares são irrigadas por ramos arteriais importantes: a glândula parótida por ramos da artéria carótida externa, a glândula sublingual pelas artérias sublingual e submentoniana e a glândula submandibular por ramos das artérias facial e lingual (Williams & Wawick, 1980).

A movimentação de compostos do plasma para a saliva envolve três processos distintos (Chiappin et al., 2007):

- ultrafiltração através de *gap junctions* entre células das unidades secretoras. Por este processo só é permitida a passagem a moléculas com peso molecular inferior a 1900 Da (água, iões e algumas hormonas, como catecolaminas e esteróides), e a sua concentração salivar é cerca de 300-3000 vezes inferior quando comparada com o plasma;

- transudação de compostos plasmáticos para a cavidade oral, do fluido crevicular ou directamente da mucosa oral (único mecanismo pelo qual é possível a albumina surgir na constituição salivar);

- transporte selectivo através da membrana celular: por difusão passiva de moléculas lipofílicas (hormonas esteróides) ou por transporte activo através de canais iónicos.

De uma maneira geral, a formação de saliva ocorre em duas fases: a primeira denomina-se formação da saliva primária – que ocorre nas células acinares - e a segunda modificação da saliva – que ocorre a nível dos ductos.

A saliva primária é uma saliva isotónica e tem uma composição em tudo semelhante à composição plasmática (relembro que esta saliva é um ultrafiltrado plasmático). No sistema de ductos a saliva primária vai ser modificada, sobretudo pela reabsorção de Na^+ e Cl^- e secreção de K^+ e HCO_3^- , o que torna a saliva que é segregada para a cavidade oral uma saliva hipotónica quando comparada com o sangue.

Temos que ter em atenção que ao falarmos de concentração electrolítica devemos sempre atentar ao facto que a concentração de um qualquer componente salivar será dependente da taxa de secreção. Quero com isto dizer que nunca será um valor absoluto, mas sim relativo. Neste contexto também devemos pensar nos factores que influenciam estas diferenças de concentração: o método de realizar a colheita da saliva, o momento dessa colheita, a idade dos sujeitos, o estado de hidratação dos mesmos e os procedimentos técnicos pelos quais a saliva tem que passar até surgir um resultado analítico são factores a considerar, que não devem ser menosprezados (Chauncey & Shannon, 1965).

Neste sentido podemos concluir que um decréscimo no fluxo salivar vai influenciar a concentração dos constituintes passíveis de medição e consequentemente a concentração dos metabolitos salivares (Santos et al., 2006).

Segundo Nauntofte e colaboradores (2005) a composição salivar normal será aquela que se segue:

Saliva primária	
Iões	Concentração (mmol/L)
Na^+	145
K^+	4
Cl^-	100
HCO_3^-	24

Saliva segregada na cavidade oral		
Iões	Concentração (mmol/L)	
	Não estimulada	Estimulada
Na ⁺	2	47
K ⁺	27	20
Cl ⁻	23	40
HCO ₃ ⁻	2	25

Segundo Chiappin e colaboradores (2007) a composição da saliva será:

Compostos inorgânicos (mmol/l)	Saliva total não estimulada	Saliva total estimulada	Plasma
Na ⁺	5	20-80	145
K ⁺	22	20	4
Cl ⁻	15	30-100	120
Ca ²⁺	1-4	1-4	2.2
HCO ₃ ⁻	5	15-80	25
Mg ²⁺	0.2	0.2	1.2
HPO ₃ ²⁻	6	3	0.05

Fazendo a comparação entre estas duas fontes concluímos que embora os valores absolutos sejam diferentes, ambos se enquadram na mesma ordem de grandeza. Ou seja, em termos relativos não diferem significativamente uma da outra.

Nota-se também que a composição da saliva não estimulada é bastante diferente da composição da saliva estimulada (esta tem uma constituição mais similar ao plasma). Por exemplo, se fizermos estimulação com alimentos ácidos haverá, como resposta, a produção de uma saliva com maior concentração de sódio, cloro e bicarbonato, e com menor concentração de potássio e fosfato, em comparação à saliva não estimulada (Jensdottir et al., 2005).

2.2 Composição salivar

A saliva é composta em mais de 99% por água. Os outros constituintes são muito variados e incluem compostos inorgânicos, orgânicos não-proteicos, proteínas / polipeptídeos, hormonas e moléculas lipídicas (Chiappin et al., 2007).

Dentro dos compostos inorgânicos podemos encontrar iões fortes e iões fracos, que juntos atribuem a capacidade de tamponamento que a saliva possui. Os iões Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cl^- , HCO_3^- e HPO_3^{2-} são considerados constituintes básicos.

Há pequenas quantidades de compostos orgânicos não proteicos que também podem ser detectados na saliva: ácido úrico, bilirrubina e creatinina; glicose, aminoácidos, lípidos como colesterol e mono/diglicerídeos de ácidos gordos; ácidos gordos como o ácido linoleico e o ácido araquidónico. O lactato também é passível de mensuração a nível salivar, sendo a sua concentração directamente relacionada com a concentração sanguínea.

O conteúdo proteico também pode ser reconhecido: amilase, IgA e anidrase carbónica (derivados da produção glandular); albumina, transferrina e IgG (derivados da passagem a favor da pressão oncótica do plasma para a saliva); lisozima, lactoferrina, lactoperoxidase, imunoglobulinas, aglutininas e mucinas (que participam na protecção dos tecidos orais); histamina e defensinas (que possuem características que permitem a morte bacteriana). É ainda de referir que, dentro das imunoglobulinas, o maior conteúdo é de IgA (> 85%) – produzidas pelos linfócitos B presentes nas glândulas salivares – seguido das IgG e IgM (5-15%), derivadas do fluido crevicular ou da passagem directa do plasma.

As hormonas que se podem encontrar na saliva são esteróides, não-esteróides, péptidos e hormonas proteicas. As catecolaminas, tiroxina e triiodotironina parecem estar presentes, sendo a sua origem ainda não completamente esclarecida (Chiappin et al., 2007). Esta detecção de hormonas esteróides já é utilizada como meio auxiliar de diagnóstico: o cortisol, a testosterona, a hidroxiprogesterona, a progesterona e a aldosterona podem, na actualidade, ser doseadas na saliva. Por exemplo, a medição do cortisol salivar em recém-nascidos, através de um novo método – papel de filtro –, permite aos profissionais de saúde fazer a avaliação da função do eixo hipotalâmico-pituitário-adrenocortical de uma forma precisa (Neu et al., 2007).

Gases como o CO_2 , O_2 e N_2 também estão presentes (Chicharro et al., 1998).

2.3 Efeitos do exercício físico na secreção e composição salivares

Segundo Chicharro e colaboradores (1998) a realização de exercício físico altera algumas das propriedades da saliva:

- Há uma diminuição acentuada no conteúdo de imunoglobulinas A, que representam a primeira linha de defesa contra vírus potencialmente patogénicos. Há estudos que sugerem que por esta razão haverá uma maior incidência de infecções do tracto respiratório superior em indivíduos que treinam de forma intensa;

- Há uma alteração do fluxo salivar, uma vez que o exercício estimula a actividade do sistema simpático e este, por sua vez, dá origem a uma vasoconstrição nas arteríolas que fornecem a irrigação às glândulas salivares, o que se traduz num volume salivar inferior. Também temos que ponderar a desidratação à qual o indivíduo está sujeito e inclusivamente a evaporação de parte da saliva devido à hiperventilação;

- Há um aumento de conteúdo proteico, em resposta à estimulação da glândula salivar realizada pela estimulação do sistema nervoso simpático;

- Há um aumento dos níveis de cortisol e lactato, devidos à estimulação do sistema simpático. O aumento destas substâncias a nível plasmático sofrerá uma repercussão ao nível salivar, uma vez que a saliva é um ultrafiltrado plasmático. As outras razões que devemos ponderar neste ponto já foram apresentadas no capítulo relativo ao lactato;

- Há alterações claras na composição iónica: aquando da realização de exercício físico submáximo observamos um aumento do nível de Na^+ com o nível de K^+ a permanecer constante; no caso de exercício anaeróbio intenso observamos um aumento dos níveis de K^+ e Mg^{2+} após a realização do teste de Wingate.

Ben-Aryeh e colaboradores (1989) levaram a cabo um estudo em que procuraram determinar qual o efeito do exercício físico na composição salivar. Para isso seleccionaram dois grupos de indivíduos: um deles foi sujeito a um tipo de exercício submáximo (teste ergométrico) e o outro ao teste de Wingate (exercício supramáximo e anaeróbio), sendo que depois de realizados os referidos testes foi colhida e analisada a saliva dos participantes. Os autores concluíram que as concentrações de sódio, potássio e lactato estavam significativamente mais elevadas no final da realização de ambos os testes (quer no caso do teste submáximo, quer no caso do teste supramáximo). Também após ambos os tipos de

exercício encontraram valores de fluxo salivar mais baixos e concentrações salivares elevadas de potássio, lactato e proteínas. A concentração de magnésio foi apenas superior após o exercício anaeróbio. Conclui-se desta forma que o lactato surge em maiores concentrações salivares após a realização de exercício físico, independentemente das características desse exercício.

3. *Cárie dentária*

O conceito inicial de cárie dentária data de 1914, quando Black a define como “a dissolução dos sais de cálcio do dente pelo ácido láctico”. Já nessa altura Black identifica a importância clara da ligação à superfície do dente pelos “fungos cariosos”. Nos dias que correm, a cárie dentária é considerada uma doença infecciosa e multifactorial – uma vez que não tem propriamente um agente etiológico major -, que, segundo a Tríade de Keyes (1960) é dependente de 3 factores principais: um hospedeiro (dente) susceptível, a presença de microorganismos com actividade cariogénica e substrato (hidratos de carbono) proveniente da dieta do indivíduo. Mais tarde Newbrun acrescenta o factor tempo, uma vez que todo o processo não é instantâneo e requer um determinado espaço temporal.

Adão Pereira publica em 1993 que a cárie “é uma doença bacteriana pós-eruptiva quase sempre caracterizada por uma destruição progressiva e centrípeta dos tecidos mineralizados dos dentes”.

Dizemos assim que a cárie dentária é um processo, e que é passível de ocorrer em qualquer superfície dentária na cavidade oral onde um biofilme microbiano consiga desenvolver-se e permanecer ancorado por um certo período temporal (Baelum & Fejerskov, 2001).

O processo de cariogénese baseia-se na desmineralização progressiva dos tecidos mineralizados da peça dentária, iniciando-se no esmalte e transmitindo-se à dentina. Num estadio posterior esta patologia pode inclusivamente envolver a polpa dentária, atingindo o rolo vaso-nervoso.

A desmineralização é provocada pela fermentação dos hidratos de carbono da dieta, realizada pelas bactérias existentes na flora oral, agregadas em grupos e constituindo o

biofilme. Estas bactérias transformam os açúcares em ácido que, por sua vez, actuam nos tecidos mineralizados causando a perda de substância e formando cavidades.

Há algumas realidades que devemos conhecer, para compreendermos melhor todo este complexo processo (Nikiforuk, 1985):

- a presença de microorganismos é um pré-requisito para a iniciação do processo carioso;
- uma única estirpe bacteriana é capaz de induzir cárie dentária;
- a capacidade bacteriana de produzir ácidos é um pré-requisito para a indução do processo carioso, mas nem todas as bactérias acidogénicas são cariogénicas.

Perante estas premissas já nos deparamos com um processo bastante mais complexo do que esperaríamos à partida. Não há propriamente uma relação linear entre um agente etiológico e a cárie dentária, ela é antes o resultado da interligação de vários determinantes, como vamos explicar de seguida.

Em jeito de conclusão, e estando absolutamente de acordo com Axelsson (2000), as lesões cariosas representam um resultado último de um extraordinário complexo sistema de bactérias inofensivas e agressivas, espécies bacterianas antagonistas e sinérgicas, os seus produtos metabólicos e a sua interacção com todos os outros factores, nomeadamente aqueles de origem salivar e os característicos do hospedeiro. Usando outras palavras, a cárie dentária não só é uma doença multifactorial, como também possui uma etiologia deveras complexa.

3.1 Determinantes do processo carioso

O processo carioso possui vários determinantes, além daqueles já referidos – o dente, a placa bacteriana e a dieta – que devem ser complementados por outros quatro: o tempo, o flúor, a saliva e os factores sociais e demográficos (Amerongen JP et al., 2001).

O tempo é um factor de suma importância e podemos interpretá-lo de duas formas distintas: por um lado, é necessário que os hidratos de carbono provenientes da dieta estejam em contacto com o dente por um período de tempo suficiente para causar a lesão inicial de cárie; por outro lado é também preciso que decorra tempo para que o processo de

desmineralização/remineralização ocorra. A cavitação pode demorar anos a produzir-se efectivamente – este espaço temporal é perfeitamente suficiente para que quer o indivíduo quer o médico dentista tomem as precauções necessárias para evitar a evolução da lesão, com o limite a ser o envolvimento da polpa.

O flúor é um factor protector do esmalte dentário, que actua inibindo a desmineralização, mais concretamente promovendo a reprecipitação dos iões fosfato e cálcio dissolvidos e assim impedindo que estes componentes sejam perdidos para a placa ou para a saliva. Além disto, o flúor vai facilitar a remineralização quando o pH for inferior a 5,5, fazendo com que haja o arrastamento da lesão e sua reparação.

Outro ponto que devemos ter atenção é que há já uma ligação estabelecida entre prevalência de cárie e nível sócio-económico do indivíduo afectado. Como factores sociais e demográficos devemos considerar além do respectivo nível sócio-económico, a educação do indivíduo, o seu comportamento perante a higiene oral, o seu nível de conhecimento, a sua atitude e inclusivamente o seu rendimento mensal.

No que diz respeito à saliva temos vários parâmetros aos quais devemos prestar a maior atenção (Nauntofte et al., 2005):

- o fluxo salivar – a diminuição da produção de saliva está associada a um aumento de lesões cariosas, uma vez que as propriedades mecânicas e de limpeza da cavidade oral estarão diminuídas. Consideramos que os indivíduos com uma taxa de fluxo salivar abaixo de 0,16 ml/min terão uma progressão da desmineralização dos tecidos duros dentários muito mais rápida;

- a capacidade tampão – consideramos que uma alta capacidade tampão salivar (devida na sua maioria ao bicarbonato) protege as peças dentárias contra o surgimento de lesões cariosas, através da redução da desmineralização;

- o pH salivar – um pH ácido salivar contribuirá para a desmineralização dentária;

- a concentração de iões cálcio e fosfato – é importante para a manutenção da saturação da saliva em relação à hidroxiapatite. É de referir que este valor estará sempre dependente da taxa de fluxo salivar.

Resumindo, o surgimento de lesões cariosas dentárias poderá estar intimamente relacionado com possíveis hipofunções das glândulas salivares. Realidades como a radioterapia

da cabeça e pescoço e manifestação do síndrome de Sjögren podem ser responsáveis pelo aumento exponencial do risco de cárie, bem como surgimento de lesões em zonas atípicas – faces linguais, bordos incisais e pontas de cúspides. Estes pacientes devem ser alvo de programas intensivos de prevenção, com instrução e motivação para a higiene oral, aconselhamento dietético, uso de clorhexidina e tratamentos com fluoretação tópica das peças dentárias.

3.2 Curva de Stephan e sua importância clínica

No início dos anos 40, Stephan demonstrou que o aumento da actividade cariosa estava associada a um decréscimo no pH da placa bacteriana *in vivo*, após a exposição a hidratos de carbono fermentáveis. O autor demonstrou, desta forma, que existe uma relação directa entre a ingestão de alimentos, o pH da cavidade oral e o surgimento de lesões de cárie dentária (Margolis & Moreno 1994).

A curva de Stephan dita original é aquela que se segue:

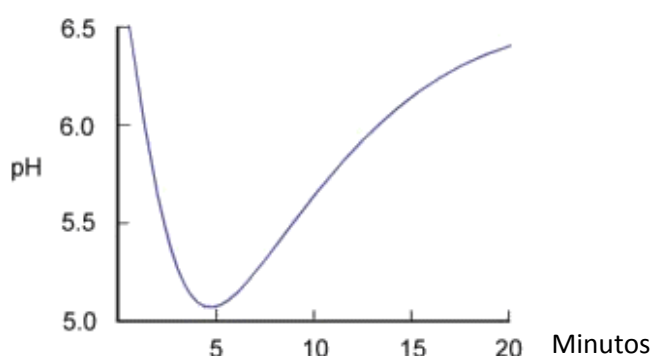


Figura 8 - Curva de Stephan original.

Nesta curva relaciona-se pH (no eixo das ordenadas) com tempo, em minutos, (no eixo das abcissas) após a ingestão de alimentos. O que retiramos desta curva é que após a ingestão alimentar há uma descida rápida do pH intraoral, até valores próximos de 5,0, sendo que após 20 minutos há uma recuperação, feita de uma forma mais gradual, até serem atingidos valores próximos daqueles observados em repouso. Esta curva desempenha um papel importante, uma vez que nos permite extrapolar algumas ideias para a clínica diária. Se a analisarmos,

podemos avaliar o nível de cariogenicidade dos alimentos, sendo que essa análise dará resultados próximos dos que se seguem,

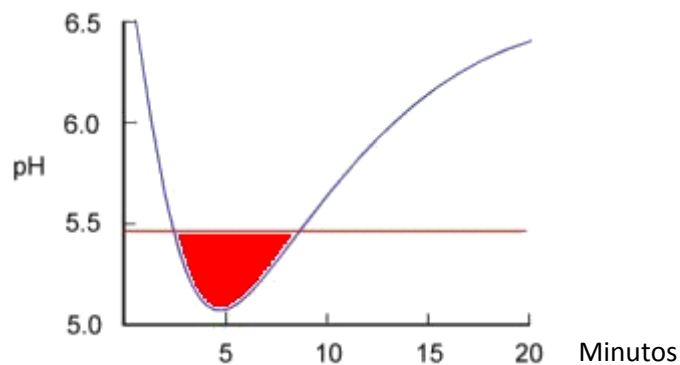


Figura 9 - Curva de Stephan com análise da cariogenicidade.

É da análise desta curva de pH/tempo que surge o valor de pH 5,5 como valor crítico para o surgimento de cárie dentária, ou seja, a um pH desta ordem de valor estarão reunidas as condições para surgir a desmineralização dentária, numa fase inicial ao nível do esmalte e numa fase mais tardia já ao nível dentinário.

Partindo destas premissas podemos pensar que, ao longo de um dia e com as refeições que fazemos, temos um risco de cárie proporcional à descida de pH que ocorre após a ingestão alimentar (Figura 10). Se quisermos ter uma ideia da realidade de uma forma esquemática temos que

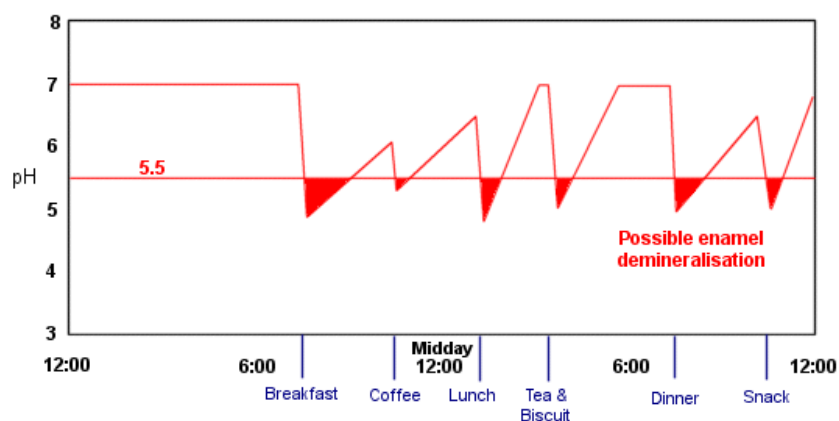


Figura 10 - Valores de pH nos quais há uma possível desmineralização do esmalte dentário.

Durante o período noturno o pH será aquele fisiológico, próximo de 7,0, não compatível com a desmineralização dentária, se forem tomados os cuidados necessários à execução de uma correcta higiene oral antes de deitar. Depois de tomado o pequeno almoço, do café do meio da manhã, do almoço, do lanche, do jantar e da ceia haverá uma quebra acentuada de pH o que se traduzirá numa possível desmineralização dos tecidos duros dentários. Essa diminuição de pH será proporcional ao conteúdo de hidratos de carbono da dieta, sendo assim explicada a diferença entre a diminuição de pH a seguir ao café e, por exemplo, a seguir ao pequeno almoço ou ao jantar.

Ao atentarmos neste mesmo gráfico será fácil chegarmos à conclusão que quanto mais refeições a pessoa fizer durante o dia maior será o risco de desenvolver lesões de cárie dentária. Se considerarmos, por exemplo, a ingestão de um pacote de guloseimas durante o dia em pequenas quantidades espaçadas por muitos momentos temporais teremos um risco muito mais acrescido do que se comermos esse mesmo pacote de guloseimas num momento único. Os hábitos alimentares das pessoas juntamente com os hábitos de higiene oral serão parâmetros muito importantes ao analisarmos toda esta dinâmica de propensão ao desenvolvimento de lesões cariosas.

3.3 *Streptococcus mutans*

O *Streptococcus mutans* é um dos maiores agentes etiológicos da cárie dentária. Em condições de excesso de hidratos de carbono, o *S. mutans* produz ácido láctico como produto final do processo de glicólise que ele próprio desenvolve, enquanto que em condições de limitação de hidratos de carbono produz acetato, formato e etanol.

A cárie dentária desenvolve-se portanto num meio de múltiplos ácidos orgânicos, cujas concentrações variam ao longo do tempo. As características fisiológicas que tornam o *S. mutans* um agente muito virulento são a sua capacidade para produzir ácidos orgânicos como produto final da glicólise e a exequibilidade de viver sem dificuldade num pH baixo, pH esse em que se dá a desmineralização do esmalte dentário (sensivelmente 5,5 como já foi justificado).

A importância que o *S. mutans* adquiriu deve-se, em suma, à sua capacidade de degradação dos hidratos de carbono e à formação rápida de grandes quantidades de ácido por um lado, e por outro lado à sua capacidade de adaptação a pHs baixos. Descobriu-se que esta

bactéria possui mecanismos que lhe permitem alterar a sua fisiologia de várias formas, incluindo sintetizar proteínas para responder ao stress, aumentar a sua actividade glicolítica e aumentar a actividade da ATPase que regula o pH intracelular (Welin-Neilands & Svensäter, 2007). Estes mecanismos torná-la-ão capaz de resistir a ambientes ácidos, como é o caso do pH crítico para o desenvolvimento da cárie (pH de 5,5).

Esta resposta adaptativa apelidou-se de ATR – resposta de tolerância ao ácido. A particularidade desta característica é que para as bactérias conseguirem efectivamente usufruir dela, tem que haver uma exposição subletal prévia a um ambiente ácido, ou seja, se colocarmos *S. mutans* em ambiente com pH 3,0 apenas uma pequena percentagem sobreviverá; contudo, se as incubarmos durante 2 horas a pH 5,5 antes de as sujeitarmos ao pH de 3,0, a sobrevivência sofre um aumento significativo.

Welin-Neilands e Svensäter (2007) no estudo que realizaram também comprovaram que, comparando células com suporte com células plasmáticas, aquelas que se fixaram ao suporte têm uma muito maior tolerância ao ácido (resultado significativo, $p < 0,05$). A adesão das bactérias a uma qualquer superfície induz alterações na expressão de genes e proteínas, o que as torna mais resistentes ao stress ambiental e também a agentes antimicrobianos. Esta adesão também é acompanhada por um aumento da tolerância ao ácido (ATR). Outra conclusão à qual estes autores chegaram é que adicionando fluoreto de sódio (NaF) ao biofilme, este actua como inibidor glicolítico (mais especificamente da enzima enolase), que leva a uma diminuição da produção de ATP. O flúor também inibe as ATPases que, juntamente com a redução de ATP no meio intracelular, impedem as bactérias de manter o seu pH intracelular em limites razoáveis para a sua sobrevivência. Este é o factor causal para a enorme diferença demonstrada ao nível de taxa de sobrevivência entre células não expostas ao NaF (87%) e células incubadas com NaF (12%).

3.4 Progressão da lesão de cárie

Já referimos que o processo da cárie dentária se inicia pela produção de ácidos orgânicos, principalmente do ácido láctico, pelas bactérias da flora oral, incluindo neste grupo o *Streptococcus mutans*.

Estes ácidos orgânicos conseguem baixar o valor de pH para valores, como já apontámos, na ordem de 5,5, valor este denominado “crítico” para a ocorrência do processo

de desmineralização. A sua progressão dá-se no sentido da difusão do ácido para dentro do esmalte e a difusão dos minerais libertados em sentido inverso, ou seja, do esmalte para o meio oral.

Uma vez destruído o esmalte e atingida a dentina, a cárie desenvolve-se muito mais rapidamente, uma vez que a dentina é um tecido com um menor teor mineral.

Reconhece-se hoje que a cárie está relacionada com ciclos, de remineralização e desmineralização (*Figura 11*), sendo que cada uma destas fases é variável com as condições do meio oral.

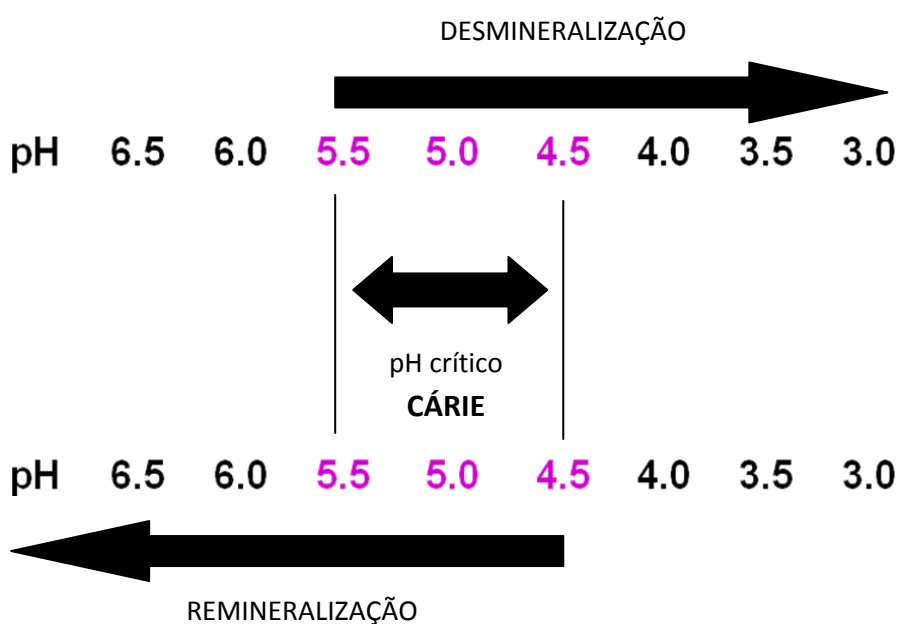


Figura 11 - Esquema representativo dos valores de pH importantes no que diz respeito o processo cariioso.

O conceito de pH crítico também importa ser esclarecido: é o valor de pH no qual a solução está saturada no que diz respeito um determinado mineral. Se o pH da solução for superior ao pH crítico, quer dizer que esta está supersaturada, ou seja, vai haver precipitação dos minerais. Se, pelo contrário, o pH da solução for inferior ao pH crítico, dizemos que é uma solução subsaturada e haverá dissolução mineral. Em condições normais, os nossos dentes não se dissolvem, uma vez que quer a saliva quer o fluido da placa bacteriana são supersaturados

em relação ao esmalte dentário. O dente sofrerá uma agressão importante e libertará iões minerais quando o pH da fase fluida for menor que o pH crítico (entre 4,5 e 5,5).

Outra questão que é importante abordar é que não há propriamente locais de susceptibilidade à cárie prédefinidos, ou seja, não há zonas de determinados dentes com uma propensão *a priori* superior a todas as outras. As lesões de cárie desenvolvem-se em qualquer local onde se permita que as bactérias se organizem em biofilmes, não havendo a sua remoção ou desorganização por forças mecânicas, sejam estas a mastigação, a atricção, a abrasão pela escovagem ou a utilização de fio dentário.

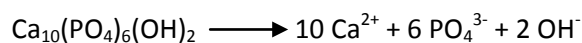
Depois de iniciada a dissolução do esmalte pelos ácidos orgânicos produzidos pelas bactérias, esta segue a direcção dos prismas de esmalte, destruindo tecido mineralizado (inicialmente esmalte e depois dentina), e no último estadio atingindo a parte central do dente – a polpa – onde se encontram os vasos sanguíneos e o nervo respectivo. Embora o próprio organismo tenha formas de se proteger do ataque bacteriano – estimulando a esclerose tubular dentinária numa primeira fase, formando dentina terciária numa segunda fase ou mesmo promovendo a regressão da cavidade pulpar em fases mais avançadas – se o processo não for interrompido e as bactérias removidas do local, a progressão até à polpa é feita de forma rápida, podendo ser a causa do aparecimento de abscessos ou mesmo de celulites.

4. **Erosão dentária**

A erosão dentária pode ser definida como uma perda irreversível dos tecidos duros dentários devida a um processo químico sem o envolvimento de microorganismos (Barbour & Rees, 2004). Amaechi & Higham (2005) acentuam a ideia de que o ácido que promove a erosão dentária é obrigatoriamente de origem não bacteriana.

Esta condição foi reportada pela primeira vez no século dezanove e desde essa altura o aumento quer da sua incidência quer da sua prevalência têm sido sucessivamente publicados. Fica demonstrado o aumento do número de casos principalmente desde que se começou a verificar uma diminuição do número de lesões cariosas em alguns países, parecendo assim haver como que uma relação inversa com a existência da cárie dentária.

Quando o dente entra em contacto com soluções ácidas, existe uma dissolução de esmalte e hidroxiapatite, com libertação de iões hidroxilo (OH^-), segundo a equação:



Magalhães, Wiegand, Rios, Honório & Buzalaf (2009) no seu artigo sobre medidas preventivas da erosão do esmalte dentário, apresentam uma imagem (*Figura 12*) que nos permite perceber melhor este processo.

Aquando da exposição da peça dentária a agentes erosivos, ácidos, de pH inferior a 4,5 (normalmente bebidas) existe um “ataque” pelos iões H^+ ao esmalte dentário, pelo que o dente liberta iões OH^- na tentativa de neutralizar os hidrogeniões do ácido. Este facto conduz à perda de estrutura dentária, o que vai originar a formação das crateras de desmineralização.

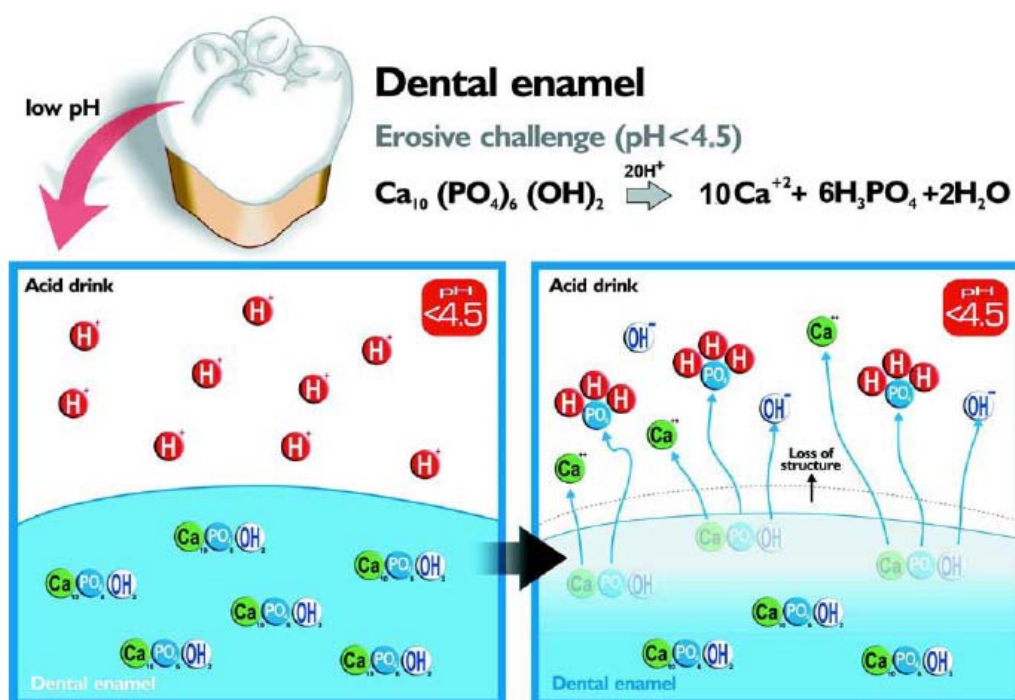


Figura 12 - Desmineralização erosiva do esmalte dentário.

Barbour and Rees (2004) consideram haver agentes etiológicos intrínsecos e extrínsecos. Nos agentes extrínsecos englobam substâncias ácidas, bebidas, alimentos, medicamentos e exposição ambiental. Como agentes intrínsecos consideram o vómito recorrente, quer em casos de bulimia e anorexia nervosa, quer em casos de regurgitação do conteúdo gástrico.

Amaechi & Higham (2005) discriminam um pouco mais estes factores: as condições médicas devem ser consideradas, como é o caso das alterações de comportamento alimentar

(anorexia e bulimia nervosas), mas não só; também devemos incluir nesta categoria os indivíduos com refluxo gastroesofágico, os indivíduos com regurgitação passiva ou indivíduos alcoólicos crónicos, que vomitam com alguma periodicidade.

Outra questão será a dos produtos ácidos provenientes da dieta: a ingestão frequente e prolongada de frutos ácidos, de sumos naturais e de bebidas ácidas, como acontece durante a prática de actividades físicas estenuantes, na colocação em recipientes para utilização durante a noite ou em utilização contínua em biberons de crianças pequenas. Esta questão é particularmente pertinente depois de estar provado que os dentes decíduos tem uma susceptibilidade uma vez e meia maior do que os dentes permanentes para serem destruídos por fenómenos de erosão dentária (Amaechi, Higham & Edgar, 1999).

As pessoas que tomam medicamentos ácidos por períodos de tempo prolongados e de uma forma frequente são também elas mais susceptíveis de desenvolverem lesões de erosão dentária. Nesta categoria de medicamentos inserimos por exemplo o ácido acetilsalicílico, o ácido ascórbico e os estimulantes ou substitutos salivares ácidos, sendo que existem mais exemplos.

A profissão do nosso paciente também deve ser alvo de atenção: os indivíduos que trabalham em unidades industriais nas quais estejam expostos a fumos ou aerossóis ácidos, como são exemplos o casos do fabrico de pilhas ou as fábricas de fertilizantes; os nadadores profissionais, que nadam em piscinas com condições de pH impróprias e os provadores profissionais de vinho são sempre indivíduos sujeitos a uma mais alta taxa de observação deste tipo de lesões.

É de referir que o uso de substâncias psicotrópicas (cocaína e ecstasy), os indivíduos lactovegetarianos (com a característica hipossalivação) e os indivíduos com hábitos de higienização dentária excessivos são também pessoas sujeitas mais facilmente a este tipo de patologia.

No que diz respeito a prevenção desta patologia podemos organizar ideias da seguinte forma (Amaechi & Higham, 2005; Magalhães et al., 2009):

Tabela 1 - Sistematização das medidas a tomar para redução da erosão dentária, no que diz respeito os factores extrínsecos e intrínsecos

Redução da exposição ao ácido	
Redução dos factores extrínsecos	Reduzir o consumo de bebidas ácidas; As bebidas ácidas devem ser bebidas rapidamente, frias ¹ e se possível através de uma palhinha; Preferir bebidas ácidas com alto conteúdo de cálcio, fosfato, flúor e xilitol.
Redução dos factores intrínsecos	Avaliação da etiologia: despiste de situações de refluxo gastroesofágico, xerostomia, bulimia e anorexia nervosas, entre outros.

Tabela 2 - Sistematização das medidas a tomar para redução do processo de desmineralização, abrangendo maioritariamente três medidas: aumento do fluxo salivar, a conduta a tomar depois de ter existido o contacto ácido e a vantagem de utilização de flúor

Redução da desmineralização	
Aumento do fluxo salivar	Mascar pastilha elástica sem açúcar; Os pacientes com xerostomia devem ser medicados com substitutos salivares.

¹ Amaechi, Higham & Edgar (1999) provaram, no seu estudo acerca dos factores que influenciam a erosão dentária, que a diferença de temperatura tem um papel fundamental. Sumo de laranja a 4 provoca uma desmineralização 5 vezes inferior ao mesmo sumo de laranja a 37°.

Conduta depois de existir o contacto ácido	Bochechar a cavidade oral com água ou leite; Consumir alimentos que neutralizem o ácido: queijo, leite (por exemplo); Não escovar os dentes imediatamente após o contacto.
Fluoretação frequente	Uso de pastas dentífricas fluoretadas, colutórios e géis de flúor.

Concluimos, portanto, que é possível prevenir o surgimento deste tipo de lesões dentárias. Basta para isso que as pessoas estejam informadas acerca da etiologia das lesões e de como poderão travar a sua evolução, uma vez que a reversão é impossível. Depois de ser perdida parte da peça dentária não é mais possível a sua regeneração, como é fácil de compreender. A única coisa a fazer é informar e motivar as pessoas para algumas mudanças de comportamentos, principalmente face ao consumo de bebidas e frutas de alto teor ácido.

5. *Lactato e cárie/erosão*

Como já foi referido anteriormente, o ácido láctico produzido pelas bactérias da espécie *Streptococcus mutans* é o ácido orgânico que induz o início do processo da desmineralização dentária (Dashper & Reynolds, 2000). Neste caso específico, como existe envolvimento bacteriano, dizemos que a desmineralização está incluída numa patologia muito mais complexa, que dá pelo nome de cárie. Podemos afirmar que a desmineralização realizada por este ácido e por todos os outros produzidos por estas bactérias dá início ao processo cariioso, que poderá ter envolvimento não só dos tecidos duros do dente – esmalte e dentina – como também pode eventualmente atingir o rolo vaso-nervoso (afectando portanto a polpa dentária).

Como também já foi esclarecido, falamos em erosão dentária quando existe efectivamente desmineralização, sendo que os ácidos que provocam esta desmineralização não podem ser de origem bacteriana. Por isso falamos em ácidos de origem intrínseca ou extrínseca.

No sentido de fazermos, então, como que um resumo da contribuição do ácido láctico nestes dois processos patológicos dentários, podemos reflectir no facto de o ácido láctico poder contribuir para estas duas realidades. Por um lado, quando produzido pelas bactérias presentes no biofilme oral, contribui de forma significativa para o início e evolução de lesões de cárie. Por outro lado, quando excretado a nível salivar e expulso para a cavidade oral, pode adicionar-se a outros ácidos provenientes da dieta ou da existência de alguma patologia (por exemplo o refluxo gastro-esofágico) e aumentar o risco de surgimento e desenvolvimento de lesões de erosão dentária. Pensamos que o ácido láctico poderá assim ser um elemento importante no que diz respeito lesões dentárias.

Capítulo IV
MATERIAL E MÉTODOS

1. **Amostra do estudo**

A nossa amostra é constituída por sessenta e oito terceiros molares (sisos) inferiores e superiores não esterilizados e conservados em hipoclorito de sódio a 0,5% (solução de Dakin) desde o momento da extracção até ao momento da sua utilização neste projecto experimental. Foram descartados todos os dentes com qualquer tipo de mancha de desmineralização, pigmentação (em especial aquela presente nas fossas e fissuras), cárie, restauração (de qualquer tipo, mesmo as preventivas como é o caso dos selantes de fissuras) ou hipoplasia do esmalte. Foram também descartados todos os dentes com ápexes ainda abertos, correspondentes a germens dentários, por terem uma estrutura mineral ainda não completamente formada.

Antes de serem preparados para a experiência a que nos propusemos, os dentes foram sujeitos a um polimento com uma escova sem utilização de nenhum tipo de pasta.

2. **Preparação dos dentes**

Trinta e dois desses sessenta e oito dentes molares foram postos em contacto com uma solução de ácido láctico de forma intermitente (intercalado com água purificada da marca FECFAR®), enquanto que outros trinta e dois foram submetidos às mesmas soluções, mas de uma forma contínua. Os restantes quatro dentes serviram como controlo, permanecendo 14 dias imersos em água purificada e sem qualquer tipo de contacto com as soluções de ácido.

Os dentes foram depois protegidos com um verniz resistente ao ácido e à água (verniz das unhas - Nivea Beauté Colour Mini®) deixando uma janela de 4 × 5 mm na superfície do esmalte (face interproximal – mesial ou distal –, consoante a sua homogeneidade em termos de textura e forma). Esta janela (realizada com recurso a papel autocolante tipo etiqueta) delimitou a zona em que o ácido actuou.

A todos os dentes foi atribuído um número (de 1 a 68), com o intuito de prevenir o surgimento de algum tipo de troca ou confundimento. Os números foram escritos a caneta nas janelas de papel autocolante (*Figura 13*).






Figura 13 - Exemplo de um dente isolado com verniz e identificado com o respectivo número e pormenor da face oclusal do mesmo dente, onde é visível a complexidade de fossas e fissuras.

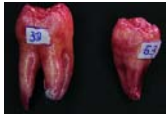
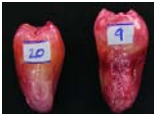
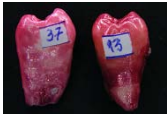
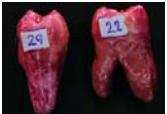
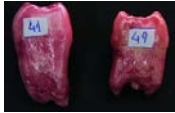
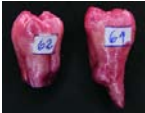
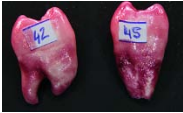
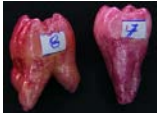
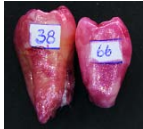
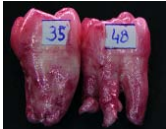
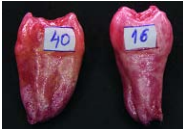
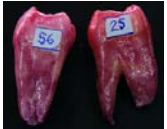




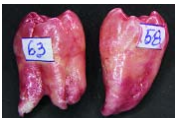



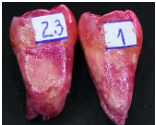
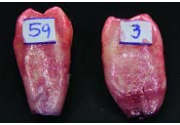
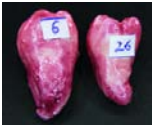

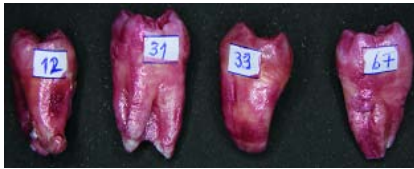
Foi particularmente tida em consideração a necessidade de isolar a superfície oclusal (Figura 13), uma vez que é aquela que, por motivos anatómicos, apresenta a maior quantidade de fossas e fissuras e portanto é sempre mais susceptível à acção da solução ácida se não forem tomadas as devidas precauções.

Realizámos a aleatorização destes números – recorrendo ao método tipo “concurso” – e desta forma foram escolhidos os dentes que pertencem aos vários grupos experimentais e ao grupo controlo.

Os resultados da referida aleatorização estão presentes na tabela que se segue (Tabela 3), juntamente com fotografias dos dentes respectivos. Nas imagens são visíveis as janelas de exposição ainda tapadas com o papel autocolante e numeradas.

Tabela 3 - Aleatorização das peças dentárias em grupos experimentais e grupo controlo.

		24 horas	3 dias	7 dias	14 dias
pH 3,5	Exposição contínua	15 e 60 	10 e 17 	50 e 54 	05 e 21 
	Exposição intermitente	04 e 32 	02 e 64 	24 e 57 	14 e 52 

pH 4,5	Exposição contínua	30 e 53 	09 e 20 	13 e 37 	22 e 29 
	Exposição intermitente	41 e 49 	61 e 62 	42 e 45 	07 e 08 
pH 5,5	Exposição contínua	38 e 66 	35 e 48 	16 e 40 	25 e 56 
	Exposição intermitente	65 e 68 	43 e 47 	27 e 46 	51 e 55 
pH 6,8	Exposição contínua	58 e 63 	19 e 39 	28 e 34 	11 e 44 
	Exposição intermitente	01 e 23 	03 e 59 	06 e 26 	18 e 36 
Controlos		12, 31, 33 e 67 			

Foi retirado o papel autocolante dos dentes, sendo que a janela de exposição foi limpa com álcool para eliminar possíveis vestígios de cola. Os dentes foram depois colocados em frascos plásticos típicos de recolha de fezes de 20 ml (*Figura 14*), aos quais foi cortada a colher que se encontrava no interior (*Figura 15*). Na parte externa do frasco foi escrita a informação relativa ao grupo em questão: valor de pH, duração da exposição, tipo de exposição e números

dos dentes que constituíam esse grupo, para não haver qualquer tipo de troca ou factor de confundimento (*Figura 16*).



Figura 14 - Exemplo de frasco de recolha de fezes utilizado, ainda com a colher no seu interior.

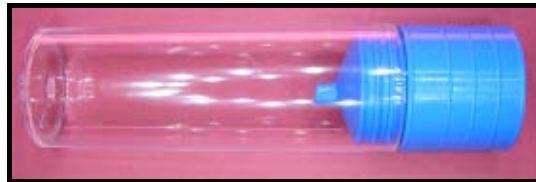


Figura 15 - Exemplo de frasco de recolha de fezes utilizado, já sem a colher no seu interior.

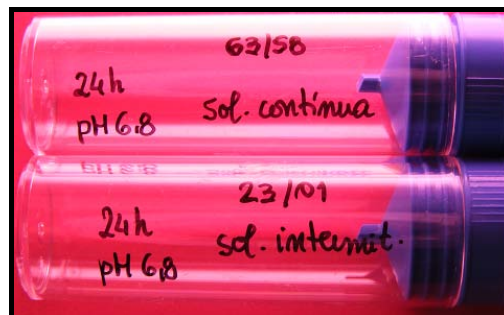


Figura 16 - Exemplo de frasco utilizado com a totalidade dos dados utilizados para a sua identificação.

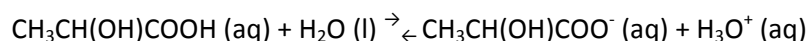
Foi realizado um registo fotográfico exaustivo de todas as peças dentárias aquando do início da realização da experiência, já com a separação por valores de pH e tipo de exposição, como fica explícito na *Tabela 3*.

3. Soluções de desmineralização

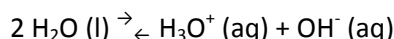
Adquirimos à SIGMA Life Science® uma embalagem de ácido láctico “DL – Lactic Acid” com concentração de 85% (W/W). Da embalagem fazem parte, além da informação da concentração, a fórmula química – $C_3H_6O_3$, a massa molecular – 90,08 g, a temperatura de ignição 113°C (235°F) e a densidade 1,209 g/cm³.

Neste estudo optámos por usar soluções de ácido láctico que causam níveis de erosão quantificáveis e passíveis de serem medidos através da microscopia. Fizemos quatro soluções diferentes, respectivamente com pH's de 3,5; 4,5; 5,5 (pH crítico para o surgimento de cárie dentária *in vivo* tendo por base a curva de Stephan, já anteriormente referida) e 6,8 (pH médio fisiológico da cavidade oral (Aframian et al 2006)).

Para realizarmos as referidas soluções tivemos que ter em consideração os equilíbrios ácido-base formados aquando da diluição do ácido láctico em água, traduzidos pelas seguintes equações:



Além deste não nos podemos esquecer de outro equilíbrio existente, que será aquele relativo à auto-ionização da água:



Apesar de o ácido láctico ser um ácido fraco (tem um K_a diminuto) ioniza-se em muito maior extensão do que a água. Assim sendo, despreza-se a contribuição desta na produção de iões H_3O^+ e considera-se que

$$[H_3O^+]_{total} = [H_3O^+]_{ácido}$$

Tendo em conta que o pKa do ácido láctico é 3,85 (Handy 2006) e que $pK_a = -\log K_a$ temos que K_a (ácido láctico) a 25° C – constante de acidez do ácido, que mede a extensão da reacção no sentido directo da mesma – é $1 \times 10^{-3,85}$, ou seja, $K_a = 1,41 \times 10^{-4}$.

A definição de K_a (constante de acidez) será:

$$K_a (\text{ácido láctico}) = [CH_3CH(OH)COO^-] [H_3O^+] / [CH_3CH(OH)COOH]$$

Pela estequiometria da reacção temos que $[H_3O^+] = [CH_3CH(OH)COO^-]$.

Partindo destes pressupostos vamos realizar as diluições necessárias para a obtenção das soluções pretendidas: pH de 3,5; 4,5; 5,5 e 6,8.

As diluições em causa foram realizadas usando a solução de ácido láctico como ponto de partida, água purificada, e soluções de hidróxido de sódio (NaOH) – soda cáustica – de concentrações $0,1 \text{ mol.dm}^{-3}$ e 2 mol.dm^{-3} , realizadas pela equipas de investigação do IBILI, Centro de Neurociências. Realizámos a aferição de valores de pH recorrendo a um medidor electrónico (pH Meter 3310 da Jenway®), com um eléctrodo continuamente no interior da solução. Para homogeneizar as quatro soluções usámos um agitador vórtex Velp®.

Fizemos as diluições necessárias, a partir da solução de ácido láctico, e com a exactidão máxima que conseguimos. Uma vez que uma microgota de ácido láctico originava mudanças bruscas de pH da solução tivemos algumas dificuldades, nomeadamente nas soluções com pH's mais altos (referentes às soluções mais básicas). Os valores que obtivemos, em rigor, foram soluções de ácido láctico de pH 3,51 ($\approx 3,50$); 4,49 ($\approx 4,50$); 5,52 ($\approx 5,50$) e 6,77 ($\approx 6,80$).

4. **Modelo de erosão contínuo**

Depois de ser retirado o papel autocolante que delimita a janela de exposição e esta ser limpa com álcool etílico a 96°, cada grupo de dois dentes foi colocado num tubo de recolha de fezes (ao qual foi previamente cortada a colher que vem acoplada à tampa), com capacidade para 20 ml (*Figura 16*). Seguidamente foram colocados nesses tubos 4 ml de cada uma das quatro soluções de ácido láctico em teste e incubados por 24 horas (dois dentes), 3 dias (dois dentes), 7 dias (dois dentes) e 14 dias (dois dentes). Para a medição destes 4 ml foi utilizada um micropipeta Gilson pipetman P1000® e pontas Gilson® de 1000 µl esterilizadas. Foi medido 1ml de cada vez e repetido o acto durante 4 vezes, para perfazer os 4 ml mencionados anteriormente (*Figura 17*).



Figura 17 - Micropipeta Gilson pipetman P1000 e pontas de 1000 µl.

Por uma questão de simplificar o transporte dos tubos, estes foram mantidos num suporte plástico, com capacidade para 40 tubos, da marca LP Italiana SPA®. Os frascos foram sempre mantidos fechados com a tampa plástica.

A exposição foi iniciada no dia 14 de Maio de 2009, com o grupo de dentes das 24 horas, sendo que o último grupo – o dos 14 dias – foi iniciado no dia 31 de Maio de 2009.

Após estes períodos de tempo as peças dentárias, que foram previamente fotografadas, foram lavadas em água corrente para remoção dos restos de ácido e limpas com papel absorvente até estarem livres de toda a humidade. Foram depois novamente colocadas nos frascos correspondentes, identificados com o número dos dentes. Por comparação com o registo fotográfico inicial foram novamente atribuídos os valores numéricos a cada peça dentária, sendo este valor escrito a caneta de acetato na superfície dentária ainda coberta pelo verniz (*Figura 18*). Este procedimento é importante para posteriormente identificarmos os dentes, aquando da realização dos cortes com o micrótomo.



Figura 18 - Exemplo de dente já sujeito à solução de desmineralização e com o número identificativo escrito sobre o verniz.

5. Modelo de erosão intermitente

Depois de ser retirado o papel autocolante que delimita a janela de exposição e esta ser limpa com álcool etílico a 96°, cada grupo de dois dentes foi colocado num tubo de recolha de fezes (ao qual foi previamente cortada a colher que vem acoplada à tampa), com capacidade para 20 ml (*Figura 16*). Seguidamente foram colocados nesses tubos 4 ml de cada uma das quatro soluções de ácido láctico em teste, sendo que de 8 em 8 horas foi alternada a solução de lactato com água purificada. Este procedimento realizou-se por 24 horas (dois dentes), 3 dias (dois dentes), 7 dias (dois dentes) e 14 dias (dois dentes). Para a medição destes

4 ml foi utilizada um micropipeta Gilson pipetman P1000® e pontas Gilson® de 1000 µl esterilizadas, como já foi referido anteriormente (*Figura 17*).

Foi medido 1ml de cada vez e repetido o acto durante 4 vezes, para perfazer os 4 ml mencionados anteriormente.

A mensuração das quantidades de água purificada foi executada exactamente segundo o mesmo protocolo e usando o mesmo material daquele utilizado para o ácido láctico, à excepção das pontas esterilizadas, que foram usadas unicamente uma vez.

Os dentes provenientes dos frascos com igual concentração de ácido láctico foram submetidos ao banho de erosão intermitente, sempre no mesmo tubo de água purificada (identificado com os números dos dentes em questão), para se evitar a contaminação entre os tubos. No grupo de exposição a 14 dias foi trocada a água purificada aos 7 dias por termos verificado que esta se encontrava turva e com muitos restos de verniz no seu interior.

Por uma questão de simplificar o transporte dos tubos, estes foram mantidos num suporte plástico, com capacidade para 40 tubos, da marca LP Italiana SPA®.

As transições entre tubos com ácido ou água purificada foram feitas com recurso a uma pinça de ponta extrafina estriada, metálica. Excluindo o tempo de alternância de soluções, os frascos foram sempre mantidos fechados com a tampa plástica.

A exposição foi iniciada no dia 14 de Maio de 2009, com o grupo de dentes das 24 horas, sendo que o último grupo – o dos 14 dias – foi iniciado no dia 31 de Maio de 2009.

Após estes períodos de tempo as peças dentárias, que foram previamente fotografadas, foram lavadas em água corrente para remoção dos restos de ácido e limpas com papel absorvente até estarem livres de toda a humidade. Foram depois novamente colocadas nos frascos correspondentes, identificados com o número dos dentes.

Por comparação com o registo fotográfico inicial foram novamente atribuídos os valores numéricos a cada peça dentária, sendo este valor escrito a caneta de acetato na superfície dentária ainda coberta pelo verniz (*Figura 18*). Este procedimento é importante para posteriormente identificarmos os dentes aquando da realização dos cortes com o micróto.

6. *Inclusão e corte no micrótomo*

No sentido de identificarmos os dentes já incluídos e devido à não simplificação da continuação de utilização dos códigos numéricos, decidimos elaborar um código mais simples, constituído por letras e números e passível de ser colocado noacrílico.

Neste quadro as letras *A*, *B*, *C* e *D* traduzem o código referente ao valor de pH (respectivamente 3,5; 4,5; 5,5 e 6,8); os números 1, 2, 3 e 4 traduzem o código referente ao tempo de exposição (respectivamente 24 horas, 3 dias, 7 dias e 14 dias); as letras *C* e *D* (numa posição subsequente ao número) traduzem o código referente ao tipo de exposição: *C* para exposição contínua, *D* para exposição intermitente e a letra *E* é referente apenas aos controlos; e os números a negrito traduzem a relação com a aleatorização inicial, efectuada aquando da separação dos dentes em grupos (*Tabela 4*).

Tabela 4 - Códigos atribuídos aos dentes de forma a ser possível a codificação noacrílico de inclusão.

	pH 3,5		pH 4,5		pH 5,5		pH 6,8	
24 horas	A1C15	A1C60	B1C30	B1C53	C1C38	C1C66	D1C58	D1C63
	A1D4	A1D32	B1D41	B1D49	C1D65	C1D68	D1D1	D1D23
3 dias	A2C10	A2C17	B2C9	B2C20	C2C35	C2C48	D2C19	D2C39
	A2D2	A2D64	B2D61	B2D62	C2D43	C2D47	D2D3	D2D59
7 dias	A3C50	A3C54	B3C13	B3C37	C3C16	C3C40	D3C28	D3C34
	A3D24	A3D57	B3D42	B3D45	C3D27	C3D46	D3D6	D3D26
14 dias	A4C5	A4C21	B4C22	B4C29	C4C25	C4C56	D4C11	D4C44
	A4D14	A4D52	B4D7	B4D8	C4D51	C4D55	D4D18	D4D36

CONTROLOS:

E12, E31, E33 e E67

Depois do aconselhamento que tivemos das pessoas que trabalham com o micrótomoto de tecidos duros existente no Departamento de Patologia Experimental da FMUC, decidimos incluir cada um dos dentes em acrílico autopolimerizável da marca Idodent®. Para isso usámos os dois componentes do acrílico: o pó (Unidesa® cor A3, 100 gramas) e o líquido (Unidesa® 50 ml), uma taça de silicone transparente pequena e uma vareta de vidro (*Figura 19*).



Figura 19 - Material utilizado para a inclusão dos dentes: os dois componentes do acrílico, a taça de silicone e a vareta de vidro.

Depois de misturados os dois componentes do acrílico e colocado o dente com a face oclusal em contacto com a base da taça de silicone, foi colocado à superfície um pedaço de papel com o código do dente em questão (*Figura 20*).



Figura 20 - Exemplo de um dente (nº 60) incluído em resina acrílica, com o respectivo código numérico atribuído.

Para acelerar a reacção de polimerização do acrílico utilizámos recipientes com água quente, onde mergulhámos as taças cheias com o acrílico, até este ficar consistente. Tivemos particular atenção com a inclusão dos dentes sempre na mesma posição, ou seja, com a face oclusal em relação directa com a base da taça de silicone, para conseguirmos ter uma ideia da localização da janela de desmineralização aquando dos cortes no micrótomoto.

Depois de incluídos e codificados os dentes já sujeitos às diferentes soluções de desmineralização, estes foram cortados no micrótomoto de tecidos duros Leitz 1600 da Leica® (*Figura 21*), presente no Departamento de Patologia Experimental da FMUC.



Figura 21 - Micrótomoto de tecidos duros utilizado, modelo Leitz 1600, da Leica.

Para a realização destes cortes o protocolo respeitado foi o seguinte: num primeiro momento colocar o dente incluído bem seguro nas garras da máquina (*Figura 22*), depois regular a espessura do corte (*Figura 23*), destravar a máquina (*Figura 24*), ligar a água (*Figura 25*) e só por último ligar o micrótomoto (*Figura 26*). O jacto de água foi sempre mantido em cima da lâmina de corte (*Figura 27*) para não haver aquecimento excessivo doacrílico. A velocidade de corte foi sempre controlada no botão do lado esquerdo do micrótomoto (*Figura 28*), sendo que quando era cortado dente nunca excedemos a velocidade de 1200 rpm (rotações por minuto) e nunca ultrapassámos a velocidade de 2000 rpm em qualquer circunstância.



Figura 22 - Garras do micrótomoto que permitem a apreensão do objecto a ser cortado.



Figura 23 - Botão que permite escolher a espessura dos cortes a realizar.



Figura 24 - Manípulo que permite destravar o micrótomo.



Figura 25 - Mangueira que permite o contínuo direccionamento do jacto de água para cima da lâmina de corte.



Figura 26 - Botão que permite ligar e desligar o micrótomo.

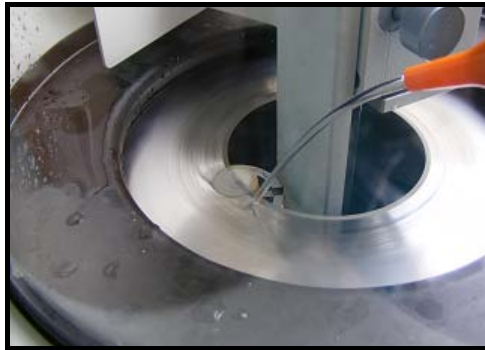


Figura 27 - O jacto de água deve ser continuamente mantido sobre a lâmina de corte.



Figura 28 - Botão de controlo da velocidade de corte.

Sempre que utilizámos o micrótomoto tivemos o cuidado de colocar e retirar a placa protectora que dele faz parte (*Figura 29*), para evitar qualquer tipo de acidente, nomeadamente qualquer dano resultante da projecção de pequenos pedaços de dente.



Figura 29 - Protecção plástica que é parte integrante do micrótomoto utilizado.

Os cortes realizados foram de 300 μm , sendo que no micrótomoto colocámos sempre o valor de 600 μm , uma vez que temos que descontar a espessura da própria lâmina do micrótomoto – 300 μm (*Figura 30*).

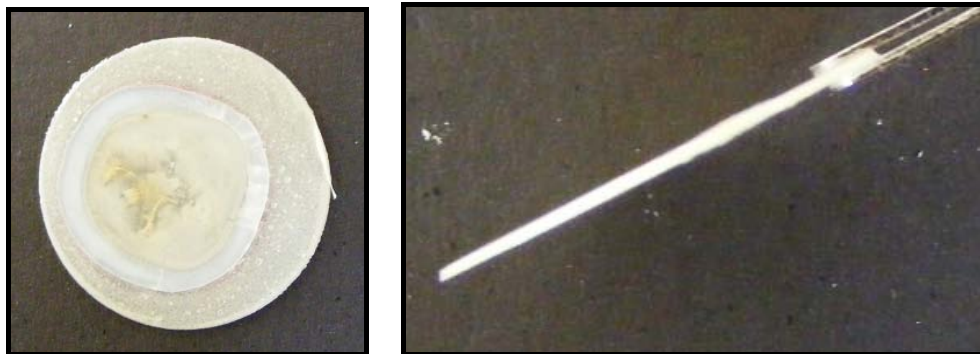


Figura 30 - Exemplo de cortes dos dentes obtidos no micrótomoto, diâmetro e espessura (300 μm).

O diâmetro total dos cortes está dependente da taça de silicone utilizada aquando da inclusão do dente em acrílico (*Figura 19*). Não é, pois, uma grandeza constante.

7. *Análise do padrão de desmineralização*

Após os dentes serem seccionados no micrótomato de tecidos duros, as pequenas secções de dente rodeado poracrílico foram colocadas em cima de uma lâmina de plástico branco opalino e observadas ao microscópio Nikon Eclipse E600® (*Figura 31*), utilizando objectivas de ampliação 2×, 4× e 10×. Foram tiradas fotografias à zona da janela de desmineralização com um sistema de aquisição de imagem digital, acoplada ao microscópio.



Figura 31 - Microscópio Nikon Eclipse E600, utilizado para visualização dos cortes dos dentes.

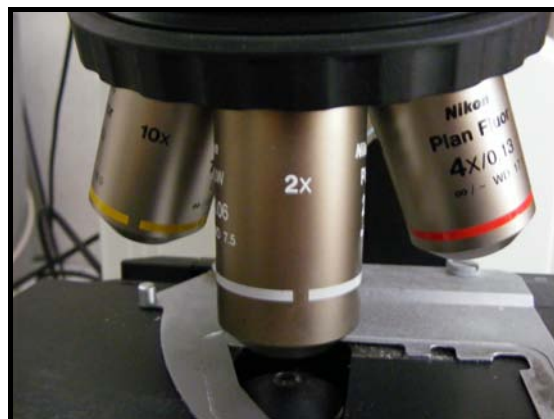


Figura 32 - Objectivas utilizadas, com ampliações de respectivamente 10× (à esquerda), 2× (ao centro) e 4× (à direita).

8. Mensuração da profundidade de desmineralização

Para mensuração da profundidade de desmineralização optámos por seguir o mesmo protocolo usado por White e colaboradores (2001) no seu estudo sobre erosão na superfície radicular, efectuada mediante um estudo *in vitro*. Depois de fotografadas as lâminas resultantes do corte no micrótomo, e analisando as fotografias obtidas, delimitámos uma linha imaginária que une as superfícies não afectadas do esmalte remanescente adjacente à lesão e medimos a maior profundidade de desmineralização (nos casos em que houve efectiva perda de substância dentária). Também Davis e colaboradores (2009) usaram o mesmo método, definindo a profundidade da lesão como a distância média entre uma linha que representa a estrutura dentária original e uma linha desenhada na base da desmineralização.

Para executarmos as medições usámos o software de edição de fotografia Adobe Photoshop CS4® versão 11.0.1, com a ferramenta da régua aferida para milímetros. Esta unidade (o milímetro medido no programa de mensuração) foi considerada a nossa unidade arbitrária, uma vez que o que pretendemos é fazer a comparação entre grupos. Os valores que surgiam na interface do programa, no campo L1, foram copiados para uma folha de Excel®.

Foram realizadas 5 medições por imagem, utilizando para todas elas a ampliação de 4x e aumentando a imagem no programa para 100% (Figura 33).

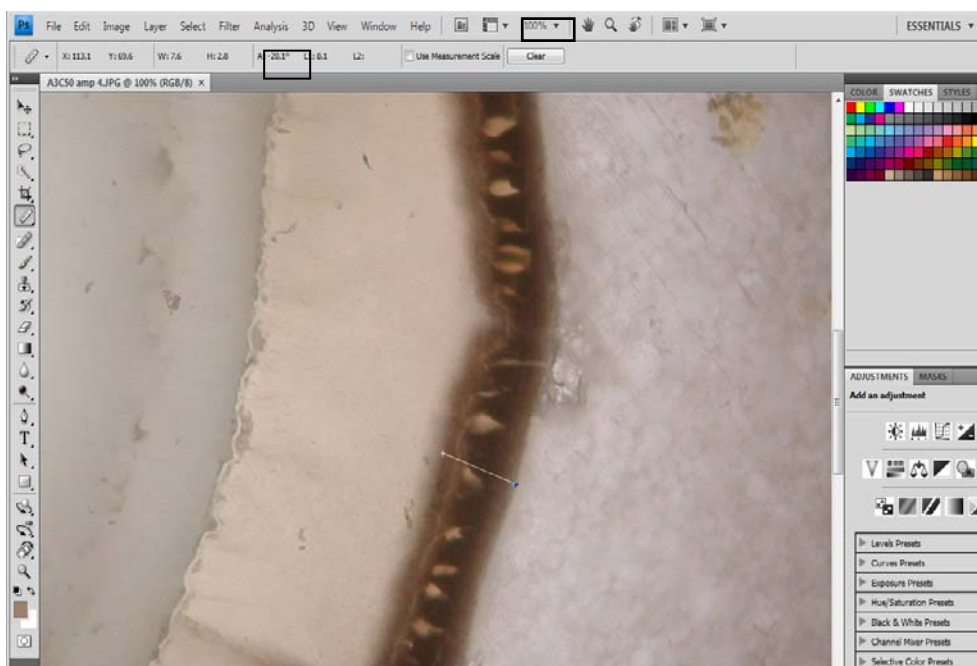


Figura 33 - Vista da interface do programa Adobe Photoshop® utilizado para a realização das medições.

9. *Análise estatística*

No sentido de responder a um dos objectivos deste estudo, procedemos à análise estatística dos resultados obtidos, para estarmos aptos a realizar a comparação entre o grupo de exposição intermitente e o grupo de exposição contínua às diversas soluções de ácido láctico investigadas.

Para tal realizámos um teste t para amostras independentes, recorrendo ao software SPSS (Statistical Package for the Social Sciences). Para além da aplicação do teste t foi também aplicado o teste de Levene. No *output* do SPSS é realizada, numa primeira fase, a estatística do grupo, com apresentação do N (número de amostras de cada grupo considerado), a média aritmética entre as amostras e o desvio padrão calculado. Numa segunda fase são visíveis os testes realizados, bem como os valores calculados pelo programa: o teste de Levene para a igualdade de variâncias e o teste t para a igualdade das médias.





















Com os resultados fornecidos pelo SPSS, para um grau de confiança de 95%, conseguimos então afirmar, de forma sustentada, da significância estatística dos valores que obtivemos quando medimos a desmineralização dentária a nível microscópico.














Capítulo V
RESULTADOS

A aleatorização das peças dentárias foi realizada recorrendo aos números atribuídos *a priori* e inscritos nas janelas de exposição (quando ainda estavam cobertas pelo papel autocolante).

O método escolhido para realizar essa aleatorização foi o tipo “concurso” (colocámos papéis com os códigos misturados num saco, e fomos tirando aleatoriamente papéis desse saco) e os dentes foram distribuídos de acordo com a tabela que se segue – tendo em conta o valor de pH, o tempo de exposição e o tipo de exposição (contínua ou intermitente) (*Tabela 5*).

Tabela 5 - Fotografias dos dentes após serem submetidos às soluções de desmineralização e novamente identificados numericamente, divididos por grupos experimentais e grupo controlo.

		24 horas	3 dias	7 dias	14 dias
pH 3,5	Exposição contínua	15 e 60 	10 e 17 	50 e 54 	05 e 21 
	Exposição intermitente	04 e 32 	02 e 64 	24 e 57 	14 e 52 
pH 4,5	Exposição contínua	30 e 53 	09 e 20 	13 e 37 	22 e 29 
	Exposição intermitente	41 e 49 	61 e 62 	42 e 45 	07 e 08 
pH 5,5	Exposição contínua	38 e 66 	35 e 48 	16 e 40 	25 e 56 

	Exposição intermitente	65 e 68 	43 e 47 	27 e 46 	51 e 55 
pH 6,8	Exposição contínua	58 e 63 	19 e 39 	28 e 34 	11 e 44 
	Exposição intermitente	01 e 23 	03 e 59 	06 e 26 	18 e 36 
Controlos		12, 31, 33 e 67 			

Esta tabela é em tudo semelhante à *Tabela 3*, sendo que, nesta última, as janelas de exposição se encontram ainda tapadas com o papel autocolante e o código numérico foi escrito nesse mesmo papel autocolante. Após a exposição às soluções de desmineralização, as fotografias foram repetidas e foi elaborada uma nova tabela – a *Tabela 5*. Nesta tabela já se pode visualizar a desmineralização nas janelas de exposição e o código numérico já está localizado no verniz e não na janela.

Depois de serem submetidos às soluções de desmineralização e de serem seccionados no micrótomo, os cortes dos dentes foram também fotografados.

As fotografias que obtivemos e sob as quais foram realizadas as medições da profundidade de desmineralização são as que se seguem (apresentaremos apenas aquelas em que verificámos existir alguma desmineralização, sendo que em todas as outras a desmineralização foi nula):

- Grupo 24 horas, pH 3,5 e exposição contínua

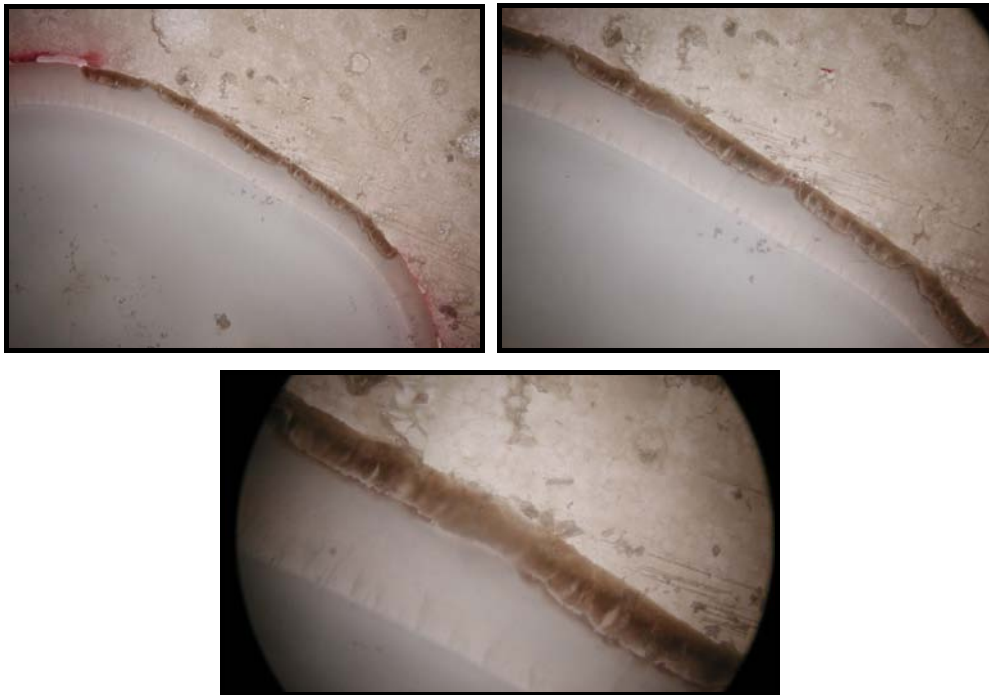


Figura 34 - Fotografias do dente A1C15 com ampliações de 2, 4 e 10 vezes respectivamente.

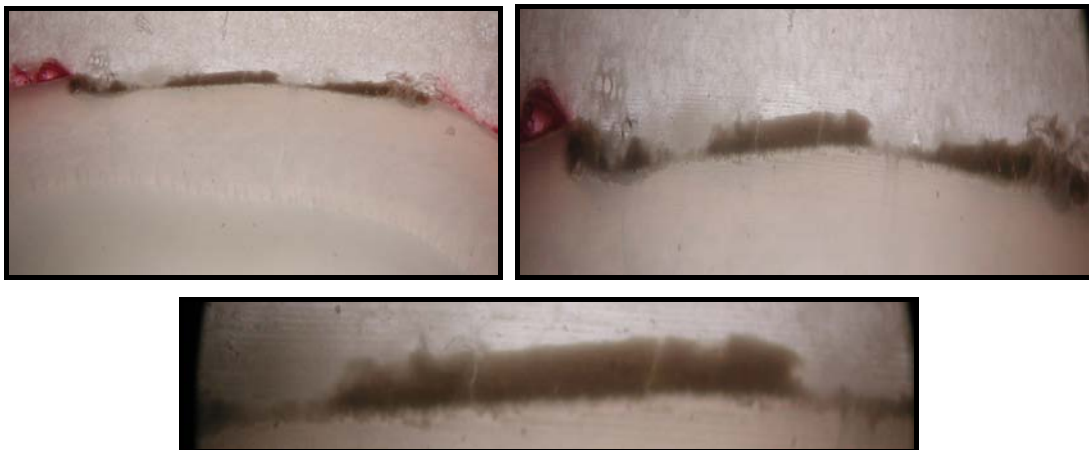


Figura 35 - Fotografias do dente A1C60 com ampliações de 2, 4 e 10 vezes respectivamente.

- Grupo 24 horas, pH 3,5 e exposição intermitente

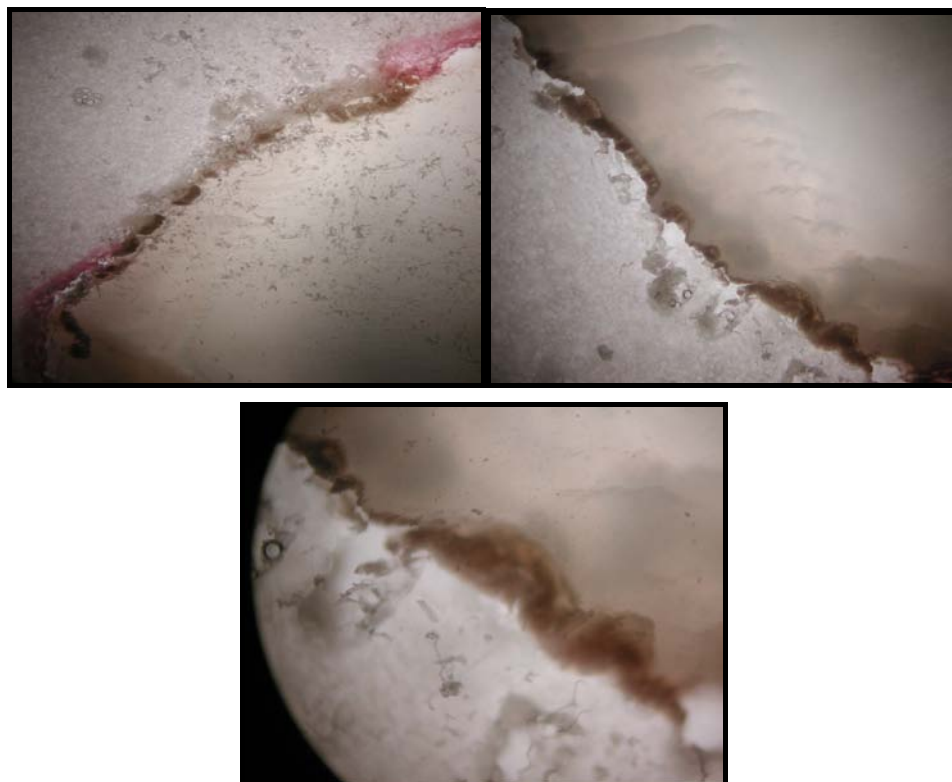


Figura 36 - Fotografias do dente A1D4 com ampliações de 2, 4 e 10 vezes respectivamente.

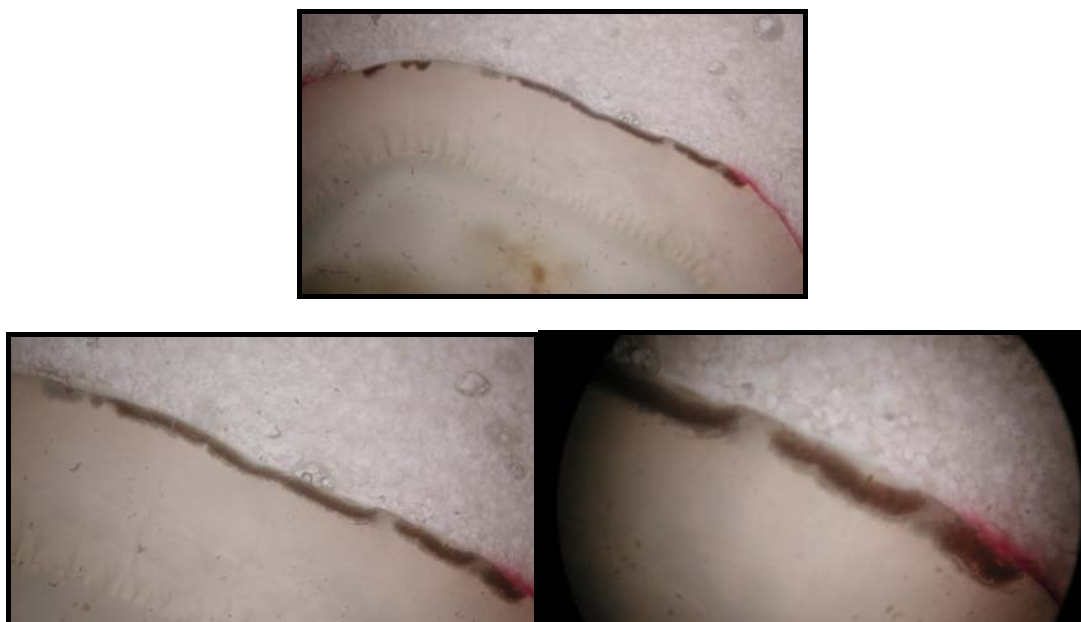


Figura 37 - Fotografias do dente A1D32 com ampliações de 2, 4 e 10 vezes respectivamente.

- Grupo 3 dias, pH 3,5 e exposição contínua

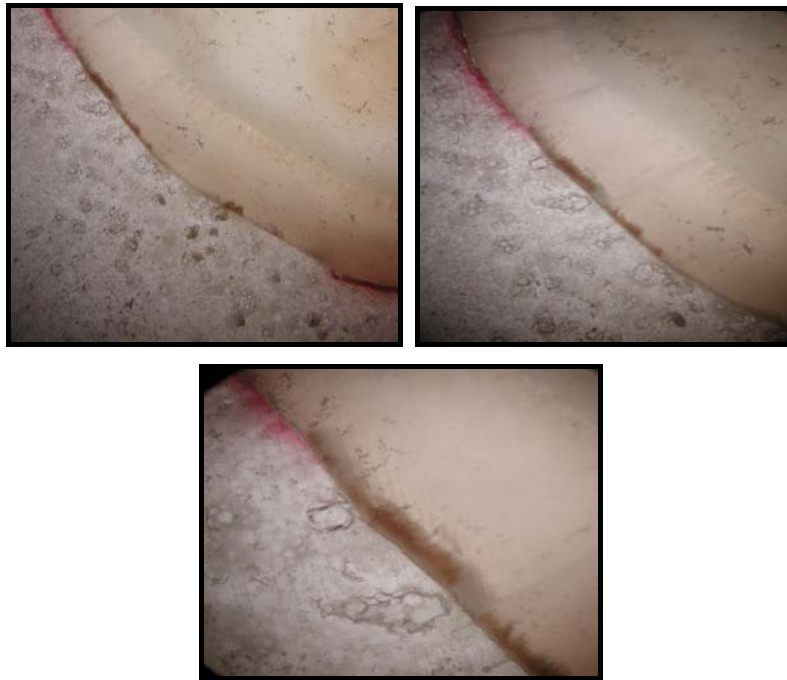


Figura 38 - Fotografias do dente A2C10 com ampliações de 2, 4 e 10 vezes respectivamente.



Figura 39 - Fotografias do dente A2C17 com ampliações de 2, 4 e 10 vezes respectivamente.

- Grupo 3 dias, pH 3,5 e exposição intermitente



Figura 40 - Fotografias do dente A2D2 com ampliações de 2, 4 e 10 vezes respectivamente.

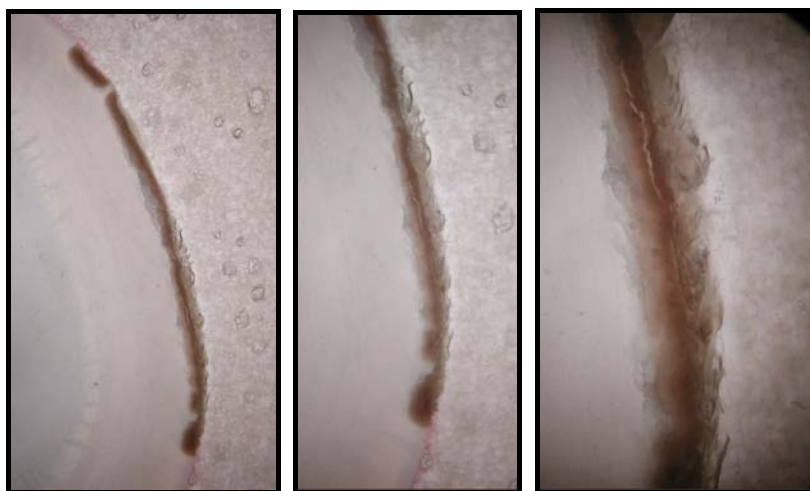


Figura 41 - Fotografias do dente A2D64 com ampliações de 2, 4 e 10 vezes respectivamente.

- Grupo 7 dias, pH 3,5 e exposição contínua



Figura 42 - Fotografias do dente A3C50 com ampliações de 2, 4 e 10 vezes respectivamente.



Figura 43 - Fotografias do dente A3C54 com ampliações de 2, 4 e 10 vezes respectivamente.

- Grupo 7 dias, pH 3,5 e exposição intermitente

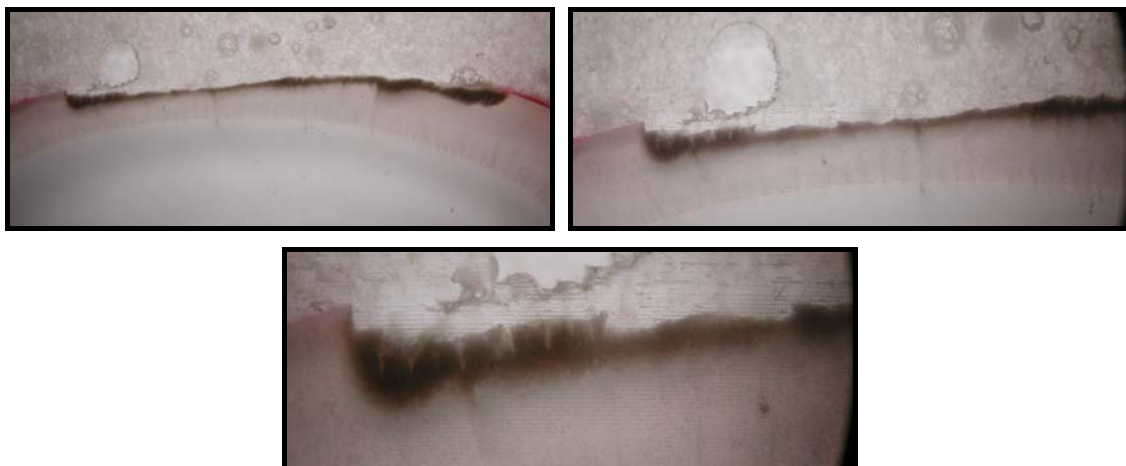


Figura 44 - Fotografias do dente A3D24 com ampliações de 2, 4 e 10 vezes respectivamente.

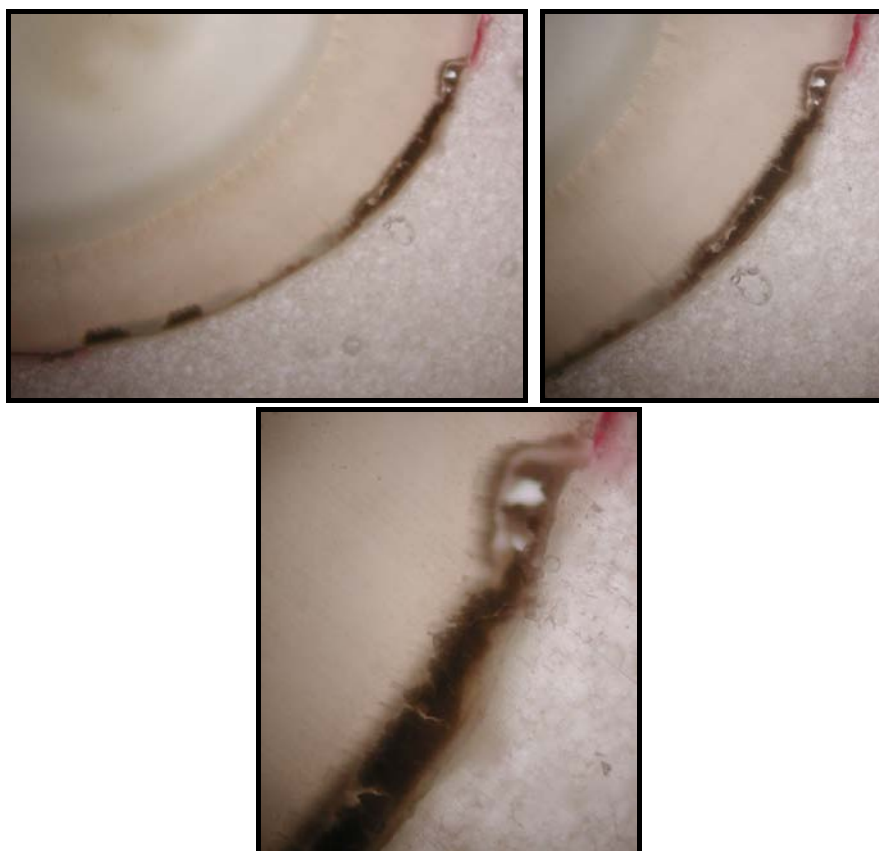


Figura 45 - Fotografias do dente A3D57 com ampliações de 2, 4 e 10 vezes respectivamente.

- Grupo 14 dias, pH 3,5 e exposição contínua



Figura 46 - Fotografias do dente A4C5 com ampliações de 2 e 4 vezes respectivamente.



Figura 47 - Fotografias do dente A4C21 com ampliações de 2, 4 e 10 vezes respectivamente.

- Grupo 14 dias, pH 3,5 e exposição intermitente



Figura 48 - Fotografias do dente A4D14 com ampliações de 2, 4 e 10 vezes respectivamente.



Figura 49 - Fotografias do dente A4D52 com ampliações de 2, 4 e 10 vezes respectivamente.

- Grupo 24 horas, pH 4,5 e exposição contínua

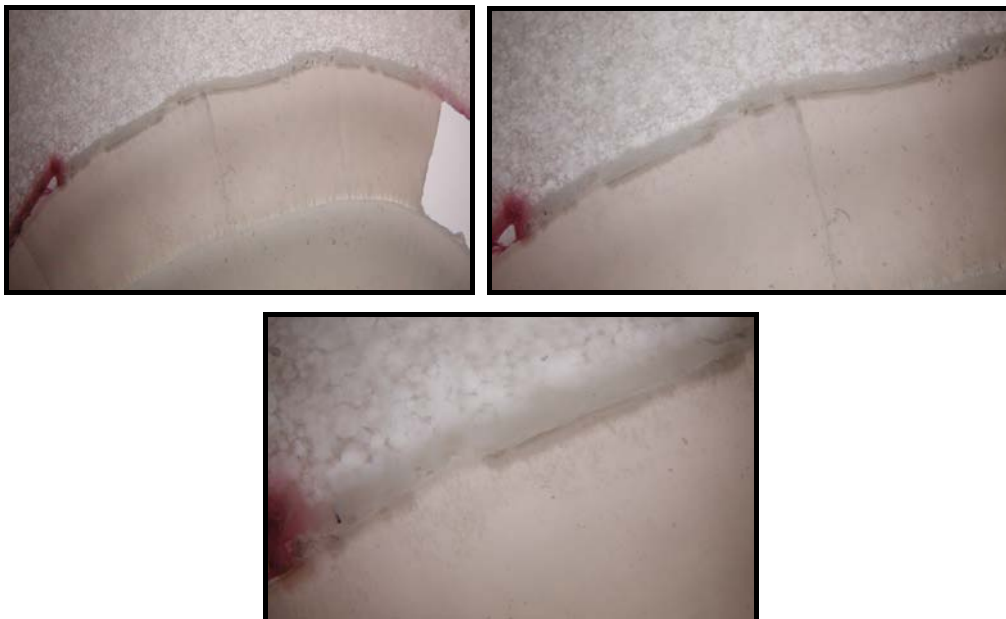


Figura 50 - Fotografias do dente B1C30 com ampliações de 2, 4 e 10 vezes respectivamente.

- Grupo 3 dias, pH 4,5 e exposição contínua

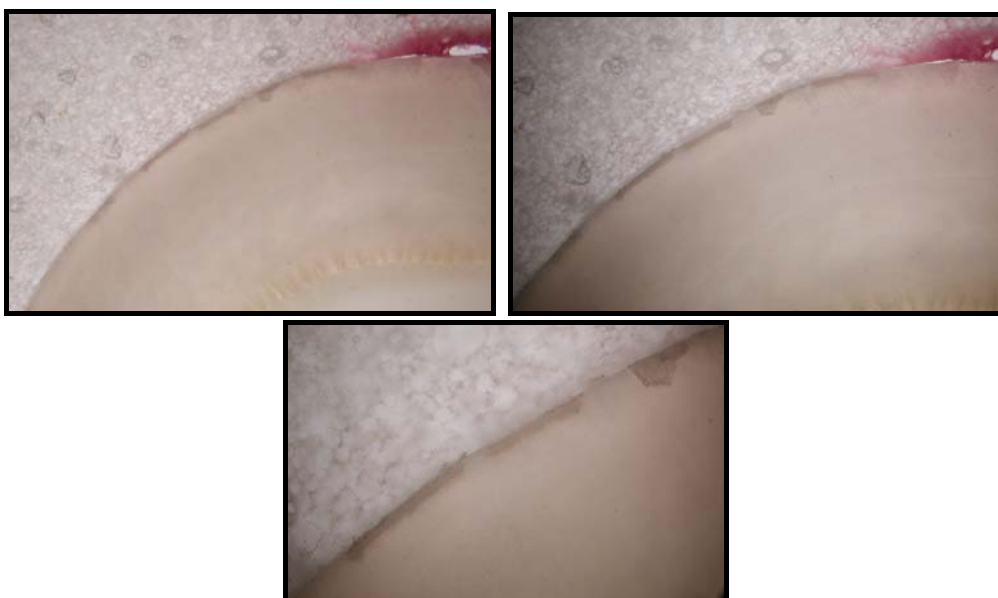


Figura 51 - Fotografias do dente B2C9 com ampliações de 2, 4 e 10 vezes respectivamente.

- Grupo 3 dias, pH 4,5 e exposição intermitente

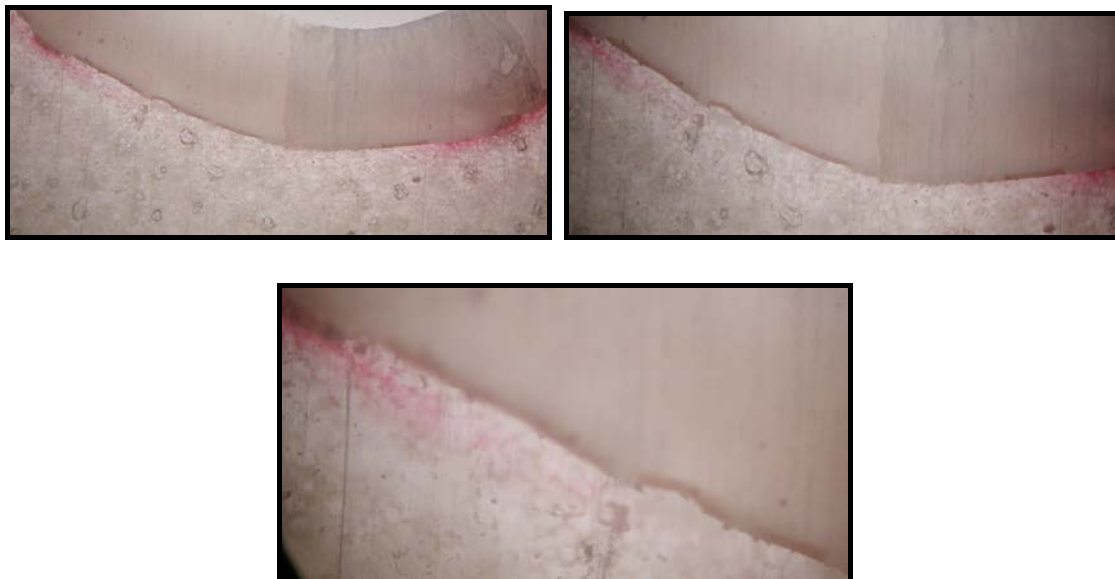


Figura 52 - Fotografias do dente B2D61 com ampliações de 2, 4 e 10 vezes respectivamente.



Figura 53 - Fotografias do dente B2D62 com ampliações de 2, 4 e 10 vezes respectivamente.

- Grupo 7 dias, pH 4,5 e exposição contínua



Figura 54 - Fotografias do dente B3C37 com ampliações de 2, 4 e 10 vezes respectivamente.

- Grupo 7 dias, pH 4,5 e exposição intermitente



Figura 55 - Fotografias do dente B3D45 com ampliações de 2, 4 e 10 vezes respectivamente.

- Grupo 14 dias, pH 4,5 e exposição contínua



Figura 56 - Fotografias do dente B4C29 com ampliações de 2 e 4 vezes respectivamente.

- Grupo 14 dias, pH 4,5 e exposição intermitente

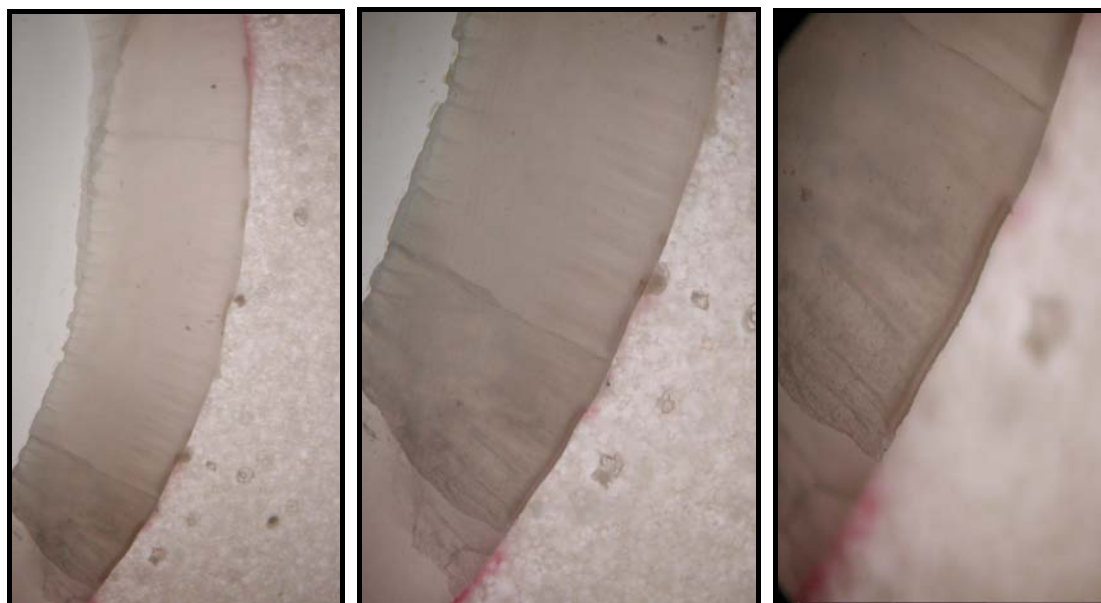


Figura 57 - Fotografias do dente B4D7 com ampliações de 2, 4 e 10 vezes respectivamente.

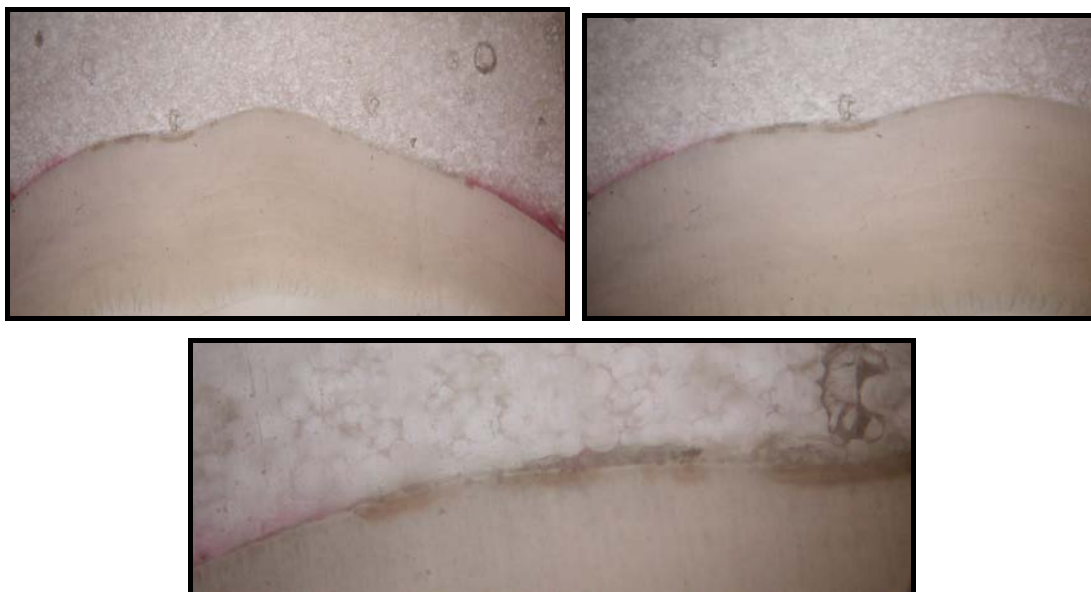


Figura 58 - Fotografias do dente B4D8 com ampliações de 2, 4 e 10 vezes respectivamente.

Depois de efectuadas as cinco medições em cada uma das fotografias dos cortes dos vários dentes, estas foram anotadas em tabelas, que são as seguintes (*Tabela 6, Tabela 7, Tabela 8, Tabela 9, Tabela 10*):

Tabela 6 - Valores obtidos por medição da zona de desmineralização (em unidades arbitrárias) nos dentes correspondentes ao primeiro grupo, de pH 3,5.

Nº do dente	1ª medição	2ª medição	3ª medição	4ª medição	5ª medição	Média
A1C15	7,0	6,9	7,0	6,6	7,2	6,9
A1C60	7,7	8,1	7,8	7,5	8,6	7,9
A1D4	9,2	8,0	8,7	8,7	7,6	8,4
A1D32	5,3	5,1	5,1	5,0	4,6	5,0
A2C10	2,2	2,6	2,6	1,9	2,8	2,42
A2C17	12,3	8,7	11,1	10,0	9,7	10,36
A2D2	6,9	7,2	8,0	7,7	7,6	7,48
A2D64	7,5	8,2	6,6	7,9	6,7	7,38
A3C50	9,1	9,0	8,6	8,9	9,0	8,92
A3C54	3,8	4,1	4,3	4,8	6,1	4,62
A3D24	8,8	8,9	9,1	8,5	8,0	8,66
A3D57	8,6	7,9	7,5	8,3	7,0	7,86
A4C5	6,2	6,4	6,6	5,1	5,0	5,86
A4C21	10,0	11,4	11,3	10,9	9,8	10,68
A4D14	11,5	11,7	12,0	11,3	10,6	11,42
A4D52	10,9	9,4	9,3	10,4	10,2	10,04

Tabela 7 - Valores obtidos por medição da zona de desmineralização (em unidades arbitrárias) nos dentes correspondentes ao segundo grupo, de pH 4,5.

Nº do dente	1ª medição	2ª medição	3ª medição	4ª medição	5ª medição	Média
B1C30	1,7	1,5	1,6	2,1	2,3	1,8
B1C53	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
B1D41	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
B1D49	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
B2C9	1,6	1,7	1,7	1,8	1,7	1,7
B2C20	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
B2D61	1,5	2,3	1,5	1,5	1,4	1,64
B2D62	1,5	1,2	1,4	1,4	1,3	1,36
B3C13	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
B3C37	2,5	2,5	2,4	2,4	2,1	2,38
B3D42	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
B3D45	2,0	1,3	1,6	2,0	1,6	1,7
B4C22	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
B4C29	1,7	2,0	2,3	1,9	1,7	1,92
B4D7	1,2	1,2	1,5	1,3	1,6	1,36
B4D8	1,2	1,3	1,6	1,8	1,3	1,44

Tabela 8 - Valores obtidos por medição da zona de desmineralização (em unidades arbitrárias) nos dentes correspondentes ao terceiro grupo, de pH 5,5.

Nº do dente	1ª medição	2ª medição	3ª medição	4ª medição	5ª medição	Média
C1C38	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C1C66	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C1D65	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C1D68	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C2C35	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C2C48	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C2D43	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C2D47	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C3C16	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C3C40	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C3D27	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C3D46	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C4C25	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C4C56	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C4D51	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C4D55	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Tabela 9 - Valores obtidos por medição da zona de desmineralização (em unidades arbitrárias) nos dentes correspondentes ao quarto grupo, de pH 6,8.

Nº do dente	1ª medição	2ª medição	3ª medição	4ª medição	5ª medição	Média
D1C58	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
D1C63	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
D1D1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
D1D23	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
D2C19	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
D2C39	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
D2D3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
D2D59	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
D3C28	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
D3C34	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
D3D6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
D3D26	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
D4C11	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
D4C44	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
D4D18	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
D4D36	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Tabela 10 - Valores obtidos por medição da zona de desmineralização (em unidades arbitrárias) nos dentes correspondentes ao grupo controlo.

Nº do dente	1ª medição	2ª medição	3ª medição	4ª medição	5ª medição	Média
E12	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
E31	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
E33	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
E67	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

1. Análise relativa ao grupo de exposição de pH 3,5

1.1 Análise dos valores de profundidade de desmineralização

Depois de olhar atentamente para a *Tabela 6*, onde estão anotadas todas as medições realizadas para os dezasseis dentes que compõem o grupo de pH 3,5, deparamo-nos com alguns aspectos dignos de registo: primeiro que a totalidade das peças dentárias sujeitas ao contacto com a solução de desmineralização de ácido láctico com este valor de pH sofreu efectivamente desmineralização, e segundo que os valores de desmineralização vão das 2,42 unidades arbitrárias (respectivas ao dente A2C10) às 11,42 unidades arbitrárias (respectivas ao dente A4D14);

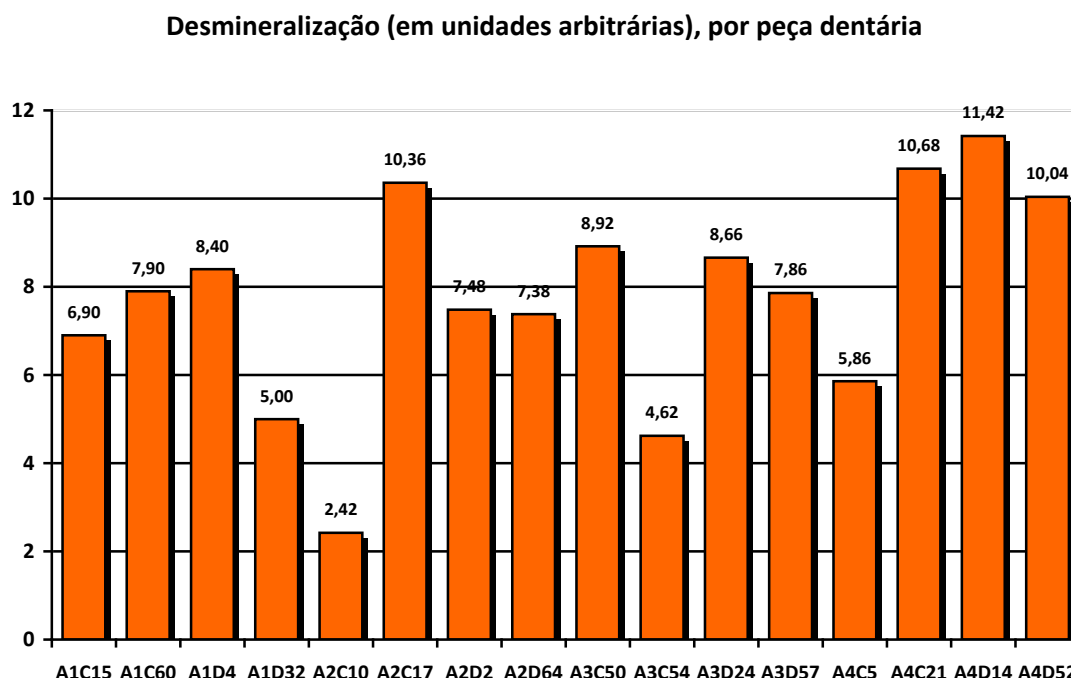


Gráfico 1 - Representação gráfica dos valores de desmineralização de cada dente pertencente ao grupo de exposição à solução de desmineralização com pH 3,5.

Terceiro, que a média de desmineralização dos dezasseis dentes que compõem o grupo é de 7,8 unidades arbitrárias. Continuando a análise dos dados que podemos obter a partir da tabela apresentada, temos que, se separarmos os dentes expostos de uma forma contínua daqueles expostos de uma forma intermitente, concluímos que a desmineralização média daqueles expostos de forma contínua é de 7,2 unidades arbitrárias, enquanto que a

desmineralização média dos expostos de forma intermitente (intercalado com água purificada) é de 8,3 unidades arbitrárias. Estes valores alteram-se ligeiramente se, ao grupo da exposição contínua, for subtraído o dente A2C10 por apresentar um valor de desmineralização consideravelmente inferior à média. Fazendo este exercício passamos a ter valores de 7,9 unidades arbitrárias de desmineralização média para o grupo de exposição contínua e as mesmas 8,3 unidades arbitrárias para o grupo de exposição intermitente.

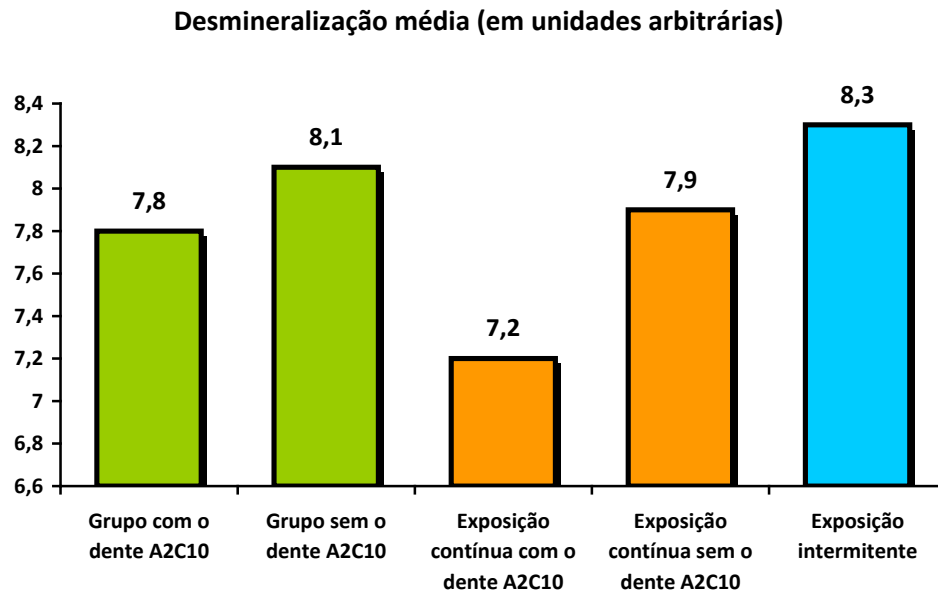


Gráfico 2 - Desmineralização média (em unidades arbitrárias) do grupo sujeito à solução de lactato com pH de 3,5, com separação entre exposição contínua e intermitente.

Fazendo os cálculos do desvio padrão temos que, para o grupo da exposição contínua, os valores obtidos foram de 2,26, ou seja, estaremos perante uma média aritmética de 7,9 unidades arbitrárias \pm 2,26 (fazendo a já referida subtração do dente A2C10 (*Gráfico 3*); se não o fizermos os valores em causa serão 7,2 unidades arbitrárias \pm 2,85); para o grupo da exposição intermitente os valores calculados são de 8,3 unidades arbitrárias \pm 1,9 (*Gráfico 4*).

A partir destes gráficos podemos denotar que o valor mínimo para o grupo da exposição contínua é 4,62 unidades arbitrárias de desmineralização – dente A3C54 – (partindo do princípio que ignoramos o valor de 2,42 unidades arbitrárias correspondente ao dente A2C10) e o valor máximo é 10,68 unidades arbitrárias de desmineralização – dente A4C21. O

valor mínimo corresponderá portanto a um dente do grupo exposto por 7 dias e o valor máximo a um dente do grupo exposto por 14 dias à solução desmineralizadora.

Valores da desmineralização (em unidades arbitrárias), por peça dentária

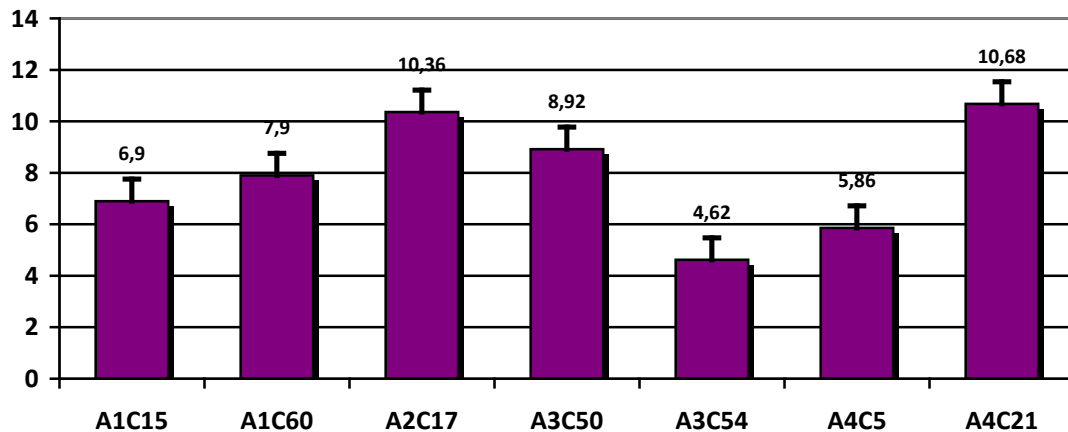


Gráfico 3 - Valores relativos ao grupo de exposição contínua, sem o dente A2C10, com média aritmética de 7,9 unidades arbitrárias e desvio padrão de 2,26.

Valores da desmineralização (em unidades arbitrárias), por peça dentária

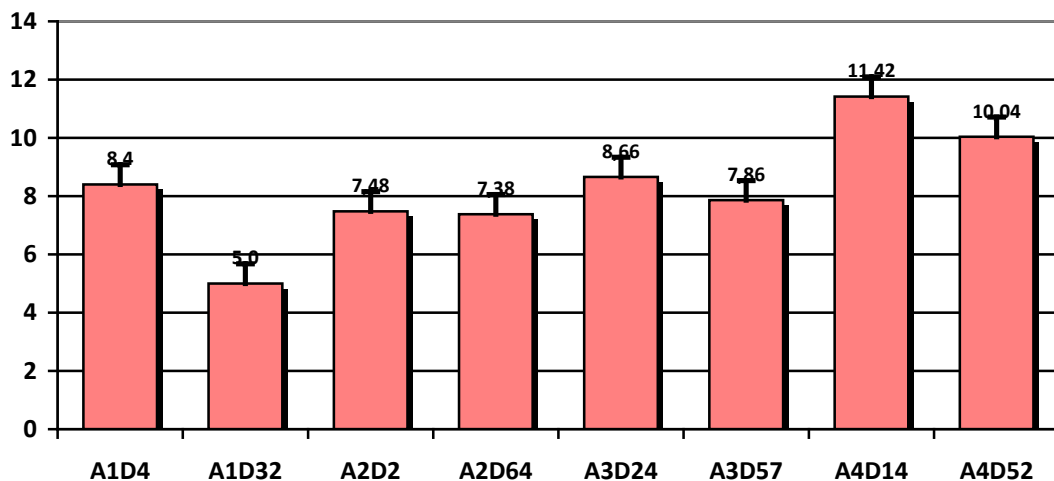


Gráfico 4 - Valores relativos ao grupo de exposição intermitente, com média aritmética de 8,3 unidades arbitrárias e desvio padrão de 1,9.

Quanto ao grupo de exposição do tipo intermitente o valor mínimo será 5,0 unidades arbitrárias de desmineralização – dente A1D32 – e o valor máximo será 11,42 unidades arbitrárias de desmineralização – dente A4D14. O valor mínimo corresponderá portanto a um dente do grupo exposto por 24 horas e o valor máximo a um dente do grupo exposto por 14 dias à solução desmineralizadora. Estes valores seriam, portanto, mais semelhantes àqueles dos quais estaríamos à espera à partida, antes de começarmos a realizar o estudo.

Perante este cenário há uma questão que nos surge imediatamente: o grupo de exposição do tipo intermitente facultar-nos resultados com diferenças estatisticamente significativas quando comparado com o grupo de exposição do tipo contínuo?

1.2 Análise estatística entre exposição contínua e intermitente

Para conseguirmos responder a esta questão, realizámos um teste t para amostras independentes, no sentido de verificar se há igualdade ou se, pelo contrário, existem diferenças entre as médias dos dois grupos considerados: o grupo das amostras com exposição contínua e o grupo das amostras com exposição intermitente. Realizámos este teste para o grupo de dentes sujeitos à solução de desmineralização com pH 3,5 e com pH 4,5.

Os resultados que obtivemos para o grupo de exposição à solução de pH 3,5 foram os seguintes:

Tipo de exposição	N	Média	Desvio padrão
Contínua	8	7,21	2,85
Intermitente	8	8,28	1,91

Recorrendo ao software SPSS (Statistical Package for the Social Sciences), aplicámos um teste t para amostras independentes – teste de Levene, com os seguintes pressupostos:

$H_0 : \mu_x = \mu_y$ vs $H_1: \mu_x \neq \mu_y$

Grau de confiança: 95%

Nível de significância: $\alpha=0,05$

O SPSS fornece dois conjuntos de resultados: um assumindo a igualdade das variâncias e outro que não admite a igualdade das variâncias. Aplicando o teste de Levene, temos que o valor de $p = 0,213 > \alpha = 0,05$. Este facto leva-nos a concluir que não podemos rejeitar a hipótese nula, ou seja, devemos considerar as variâncias iguais. Aplicando o teste de t, temos que o valor de $p = 0,392 > \alpha = 0,05$. Este facto leva-nos a concluir que não podemos rejeitar a hipótese nula, ou seja, devemos considerar as médias iguais.

De acordo com estas conclusões podemos assumir que a desmineralização média dos dois grupos é igual. Como, para um intervalo de confiança de 95%, obtivemos um mínimo de -3,67 e um máximo de 1,53 e este intervalo engloba o valor 0 concluímos que não existem diferenças estatisticamente significativas entre os grupos de dentes sujeitos à solução desmineralizadora com pH 3,5 de forma contínua ou intermitente.

1.3 Análise do padrão de desmineralização

Outra questão se levanta aquando da observação atenta dos padrões de desmineralização do grupo sujeito à solução de desmineralização de ácido láctico com pH 3,5. Enquanto há dentes em que houve realmente perda de substância mineral dentária (provavelmente tendo sido diluída na solução desmineralizadora envolvente), como é o caso do dente A3D24 (*Figura 44*) e do dente A2C17 (*Figura 39*), outros há em que, embora se note alguma desmineralização, com perda da imagem histológica fisiológica do esmalte, não há perda de substância, isto é, o contorno do esmalte encontra-se intacto, como é o caso do dente A1C15 (*Figura 34*). Ainda dentro da mesma temática temos que há dentes em que a desmineralização foi feita de forma uniforme pela superfície de esmalte (caso do dente A2D64 - *Figura 41*, enquanto que outros sofreram uma desmineralização “em ilhas”, ou seja, de forma descontínua – como é exemplo o dente A1D4 (*Figura 36*).

Ao longo deste trabalho deparámo-nos com reacções bastante díspares em termos de desmineralização propriamente dita, por parte de todas estas peças dentárias. Não houve propriamente um padrão, nem uma relação directa entre tempo de exposição e profundidade de desmineralização, nem mesmo um aumento de “gravidade” da lesão nos valores de pH mais ácidos. Acabámos por encontrar imagens muito engraçadas, algumas mesmo intrigantes. Foi o que aconteceu com o dente A3C50 (*Figura 42*), que apresenta um padrão geométrico de desmineralização, como que com um entrançado, completamente diferente de todos os

outros dentes submetidos às diversas soluções de ácido láctico (e refiro-me a todos os grupos, com valores de pH's diferentes, tempos de exposição diferentes e forma de exposição também diferente). Este dente será a prova que, na realidade, haverá um factor determinante no que diz respeito à protecção exibida pelo esmalte dentário às soluções desmineralizadoras no geral. Outras provas serão todos os outros dentes que apresentam maior ou menor lesão, contínua ou intercalada, mais ou menos profunda.

2. *Análise relativa ao grupo de exposição de pH 4,5*

2.1 *Análise dos valores de profundidade de desmineralização*

Depois de olhar atentamente para a *Tabela 7*, onde estão anotadas todas as medições realizadas para os dezasseis dentes que compõem o grupo de pH 4,5, facilmente chegamos à conclusão que os valores apresentados em nada se assemelham àqueles obtidos para o grupo da solução com pH 3,5. Se convertermos a informação constante na tabela para um figurino tipo gráfico, para ser mais fácil a apreensão dos dados, temos que:

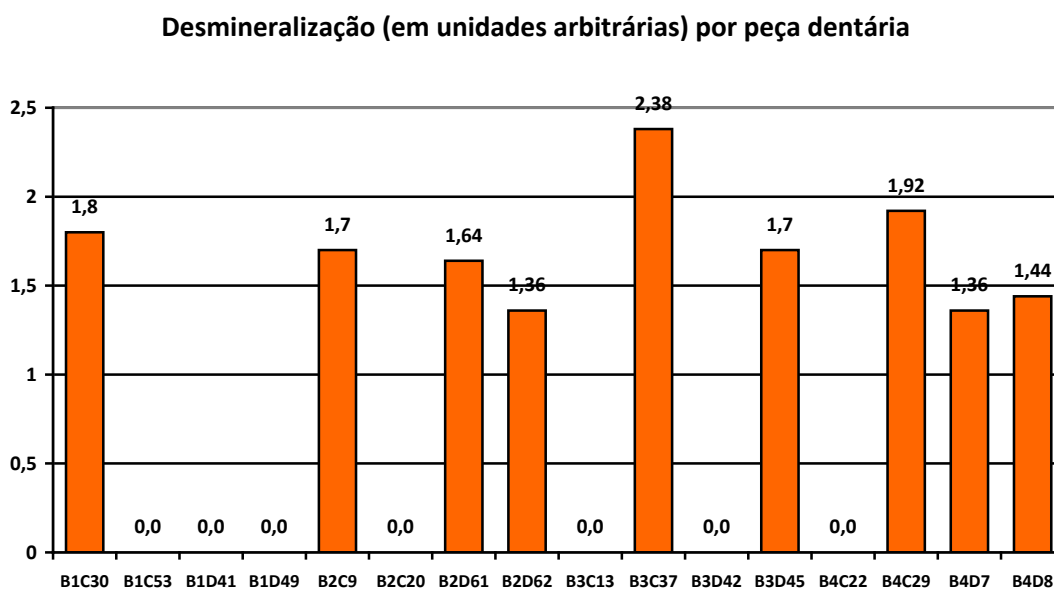


Gráfico 5 - Representação gráfica dos valores de desmineralização de cada dente pertencente ao grupo de exposição à solução de desmineralização com pH 4,5

Recordando o *Gráfico 2* (respeitante aos valores apurados para pH de valor 3,5) em que a média de esmalte desmineralizado andaria à volta de valores como 8,0 unidades

arbitrárias, denotamos que ao aumentar o pH para 4,5 acontecem duas situações distintas: a primeira é que surgem dentes (7 deles) que não desmineralizam em absoluto, e a segunda é que aqueles que efectivamente sofrem desmineralização, sofrem-na numa quantificação muito inferior (de uma média de 7,75 unidades arbitrárias no grupo de pH 3,5 passamos para uma média de 1,7 unidades arbitrárias neste grupo de pH 4,5).

Outro facto que também nos surge como verdadeiro é que no grupo da exposição pelo período mínimo (24 horas) apenas 1 dente sofreu desmineralização, sendo que nos grupos de exposição por 3, 7 e 14 dias nunca aconteceu a totalidade dos dentes sofrerem perda mineral – no grupo de 3 dias houve 3 dentes que desmineralizaram; no grupo de 7 dias apenas 2 dentes sofreram desmineralização e no grupo de 14 dias foram novamente 3 dentes que apresentaram imagens microscópicas compatíveis com o evento desmineralizador.

Os 7 dentes que não sofreram qualquer tipo de desmineralização correspondem a 43,75% do total de peças dentárias expostas a esta solução desmineralizadora (n=16), como está representado no gráfico que se segue,

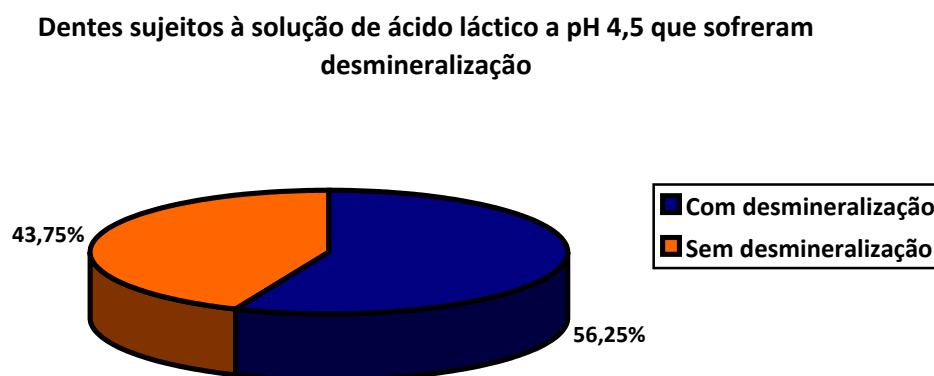


Gráfico 6 - Percentagem de peças dentárias que, quando sujeitas à solução de ácido láctico com pH 4,5, apresentaram sinais de desmineralização

Da análise mais aprofundada dos valores apresentados verificamos que o valor máximo de desmineralização – 2,38 unidades arbitrárias – ocorreu no dente B3C37 (*Figura 54*), que pertence ao grupo da exposição de 7 dias e de forma contínua (recordo que o valor máximo obtido no grupo de pH 3,5 observou-se na exposição por 14 dias e de forma intermitente - *Figura 48*) e o valor mínimo de desmineralização ocorreu nos dentes B2D62 (*Figura 53*) e B4D7 (*Figura 57*), ambos com 1,36 unidades arbitrárias, que pertencem

respectivamente ao grupo de exposição de 3 dias de forma intermitente e ao grupo de 14 dias também de forma intermitente.

Através do cálculo do desvio padrão obtivemos um valor de 0,32, ou seja, a média de desmineralização será 1,7 unidades arbitrárias \pm 0,32.

2.2 Análise estatística entre exposição contínua e intermitente

Os resultados que obtivemos para o grupo de exposição à solução de pH 4,5 foram os seguintes:

Tipo de exposição	N	Média	Desvio padrão
Contínua	8	0,975	1,06
Intermitente	8	0,938	0,78

Recorrendo ao software SPSS (Statistical Package for the Social Sciences), aplicámos um teste t para amostras independentes – teste de Levene, com os seguintes pressupostos:

$$H_0 : \mu_x = \mu_y \text{ vs } H_1: \mu_x \neq \mu_y$$

Grau de confiança: 95%

Nível de significância: $\alpha=0,05$

O SPSS fornece dois conjuntos de resultados: um assumindo a igualdade das variâncias e outro que não admite a igualdade das variâncias. Aplicando o teste de Levene, temos que o valor de $p = 0,023 < \alpha=0,05$. Este facto leva-nos a concluir que devemos aceitar H_1 , ou seja, não há homogeneidade entre as variâncias. Aplicando o teste de t, temos que o valor de $p = 0,937 > \alpha=0,05$. Este facto leva-nos a concluir que não podemos rejeitar a hipótese nula, ou seja, devemos considerar as médias iguais.

De acordo com estas conclusões podemos assumir que a desmineralização média dos dois grupos é igual. Como, para um intervalo de confiança de 95%, obtivemos um mínimo de -0,97 e um máximo de 1,05 e este intervalo engloba o valor 0 concluímos que não existem

diferenças estatisticamente significativas entre os grupos de dentes sujeitos à solução desmineralizadora com pH 4,5 de forma contínua ou intermitente.

2.3 Análise do padrão de desmineralização

Depois de observadas atentamente as imagens histológicas provenientes deste grupo de dentes há outras duas características que saltam facilmente à vista: não há paralelo entre os padrões de desmineralização, ou seja, as imagens dos dentes que desmineralizaram quando sujeitas à solução com este pH (4,5) não são nem semelhantes àsquelas do grupo do pH de 3,5; e quando houve efectivamente desmineralização, esta não envolveu perda de substância dentária, isto é, houve apenas uma primeira fase de desmineralização, com perda de arquitectura normal e hipomineralização, mas sem ocorrência de cavitação. Exemplo disso é a comparação entre a *Figura 41* e a *Figura 52* (por exemplo).

3. Análise relativa aos grupos de exposição de pH 5,5 e 6,8

Prestando atenção à *Tabela 8* e à *Tabela 9* concluímos que, no que diz respeito estes valores de pH (respectivamente 5,5 e 6,8), não houve desmineralização em nenhuma das peças dentárias sujeitas às soluções de ácido láctico com estas características.

Na totalidade das imagens dos cortes obtidos ao microscópio não existe descontinuidade alguma entre os dois extremos do esmalte, correspondentes à zona da janela de exposição.

Capítulo VI

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

1. Objectivos do estudo

Quando idealizámos o nosso trabalho procurámos delinear-lo de forma a que conseguíssemos respostas claras à totalidade dos objectivos a que nos propusemos à partida. Por este motivo, escolhemos para objecto de estudo a acção do ácido láctico sobre a superfície mineralizada de peças dentárias seleccionadas para o efeito. Esta escolha foi baseada em dois pressupostos distintos: o primeiro prende-se com o facto de efectivamente ser o ácido láctico aquele que é produzido a nível muscular quando um indivíduo executa exercício físico de alta intensidade, sendo posteriormente lançado na corrente sanguínea e não ser qualquer outro tipo de ácido (Dubouchaud et al., 2000; Van Hall, 2000; Juel, 2001; Cerretelli & Samaja, 2003; Gladden, 2004; Kristensen et al., 2005; Handy, 2006; Messonier et al., 2007) e o segundo pressuposto prende-se com o facto de serem as bactérias acidófilas que desencadeiam o processo inicial de desmineralização que depois leva ao surgimento de lesões de cárie dentária, nomeadamente aquelas produtoras de ácido láctico, como é o caso do *Streptococcus mutans*, o principal agente etiológico da cárie dentária. Também nesta vertente está presente o ácido láctico (Dashper & Reynolds, 2000; Welin-Neilands & Svensäter, 2007).

2. Material e Métodos

Escolhemos para a realização deste estudo terceiros molares, superiores ou inferiores, extraídos a pacientes jovens, pelo motivo principal de correcção ortodôntica, uma vez que estes seriam os dentes que mais facilmente reuniriam o critério de inclusão: serem hígidos (excluimos todos aqueles com fissuras pigmentadas, lesões cariosas, restaurações, selantes de fissuras e hipoplasias de esmalte de qualquer grau).

Os dentes molares são os dentes mais susceptíveis a uma experiência de cárie, quando comparados com incisivos, caninos ou pré-molares (Macek et al., 2003). Os sisos são dentes com risco elevado quer de experiência de lesões de cárie, quer de experiência de patologia periodontal: 79% dos doentes que atingem a oitava década de vida apresentam evidência clínica de experiência de cárie ou de patologia periodontal nos terceiros molares (Moss et al., 2007). Dentro do grupo dos terceiros molares há evidência científica que suporta a tese que os terceiros molares mandibulares têm uma maior probabilidade de desenvolverem lesões cariosas do que os terceiros molares maxilares. Além disso, também sabemos que quase a totalidade (98 a 99%) dos pacientes que desenvolvem lesões de cárie nos terceiros molares

têm experiência de lesões cariosas nos primeiro ou segundo molares e que, em contrapartida, a ausência de cáries nos primeiros ou segundos molares está associada a terceiros molares livres de cárie (Shugars et al., 2005). As lesões de cárie parecem surgir com maior expressão quando os dentes ainda não atingiram o plano oclusal, provavelmente porque uma posição anatómica mais baixa que o plano oclusal parece fazê-los mais susceptíveis às bactérias patogénicas capazes de provocar o surgimento de lesões de cárie (Ahmad et al., 2008).

Sabemos também que devido a factores anatómicos da superfície oclusal dos terceiros molares estes dentes têm uma probabilidade mais alta de desenvolverem lesões de cárie. Para isso contribuem as fossas e fissuras oclusais, profundas e muitas vezes múltiplas, que levam à acumulação de placa bacteriana organizada nas superfícies dentárias.

Embora as superfícies oclusais dos terceiros molares sejam as faces mais prováveis para o desenvolvimento de lesões de cárie, optámos por desmineralizar as superfícies interproximais (mesiais ou distais) dos mesmos terceiros molares derivado ao nosso objectivo inicial: provar, inequivocamente, que o ácido láctico, quando em actuação isolada, é capaz de desmineralizar a superfície dentária (no caso do nosso estudo debruçámo-nos sobre o esmalte) exposta às soluções. Além deste factor, verificámos que a própria técnica é mais simples quando aplicada numa superfície lisa e polida do que numa superfície com sulcos e fissuras como é a face oclusal, uma vez que nestas últimas não temos como garantir a exposição da peça dentária às diferentes soluções de desmineralização na área pré-estabelecida e constante (o rectângulo de exposição de 4 × 5 mm). Esta opção também já tinha sido tomada por Davis e colaboradores (2009) no seu artigo sobre erosão dentária e sumos enriquecidos.

Procedemos à limpeza da superfície de esmalte das peças dentárias, antes de ser realizado o isolamento da janela de exposição, através da execução de um polimento com uma escova sem utilização de nenhum tipo de pasta. Optámos por este procedimento para que fossem removidos todos os possíveis detritos orgânicos remanescentes, nomeadamente de ligamentos periodontais ou de sacos embrionários. White, McIntyre & Logan (2001) referem-se a este passo como “raspagem gentil dos restos superficiais e de possível tecido mole”. Amaechi, Higham & Edgar (1999), por seu lado, defendem a “limpeza e polimento com pedra pomes e posteriormente com lixa abrasiva e água”. McIntyre, Featherstone & Fu (2000) descrevem o seu procedimento como “uma limpeza cuidadosa do material de ligamento periodontal superficial, recorrendo a uma escovagem com detergente neutro morno”. A não

utilização de nenhum tipo de pasta nem outro qualquer material (como detergentes ou sabões) relacionou-se com o objectivo de não interferir com nenhum passo do trabalho experimental. A utilização apenas da escova ficou a dever-se à tentativa de não alterar minimamente o esmalte aprismático, localizado na superfície externa do mesmo. cremos que a utilização de lixas abrasivas e de pedra pomes vai interferir com o já referido esmalte aprismático, podendo ser o responsável pela alteração da superfície dentária e consequentemente pela fragilização da estrutura de esmalte a que nos propusemos estudar.

Como preconizado por uma multiplicidade de autores (White, McIntyre & Logan, 2001; Amaechi, Higham & Edgar, 1999; McIntyre, Featherstone & Fu, 2000), realizámos o isolamento do dente recorrendo a um verniz de unhas resistente ao ácido e à água, para garantir que só a nossa janela de exposição sofreria as consequências do contacto com as soluções de ácido láctico. Encontrámos apenas um artigo que recorria ao isolamento através de uma resina polimerizável por luz ultravioleta – Scotchbond® da 3M (Margolis et al., 1999) e um outro que advogava o isolamento do dente com cera (Arnold et al., 2007). Pensamos que o uso do verniz é mais vantajoso, uma vez que como é colorido e a resina é incolor, permite-nos saber com certeza que toda a margem que envolve a janela de exposição está efectivamente isolada. Na comparação com a cera, também pensamos que o verniz é mais adequado, porque nos permite uma mais fácil colocação, uma vez que a cera teria que ser aquecida e seria complicado garantir a homogeneidade de espessura ao redor da totalidade do dente.

Preferimos usar uma janela de exposição à solução desmineralizadora de dimensões consideráveis (4 mm × 5 mm), quando comparadas com outras presentes em artigos que consultámos. No entanto a pluralidade de escolhas feitas neste campo é tão grande que encontrámos autores que preconizam a utilização de janelas de 3 mm × 3 mm (West, Hughes & Addy, 2000), janelas de área total 7 mm² (Eisenburger, 2009), janelas de 3 mm × 5 mm (Elton et al., 2009), janelas de 1 mm × 4 mm (Davis et al., 2009), janelas de 3 mm × 1 mm (White, McIntyre & Logan, 2001). Tal facto ficou a dever-se ao objectivo de simplificação aquando do corte no micrótopo de tecidos duros das peças dentárias - como tínhamos que fazer a inclusão dos dentes em acrílico preferimos escolher janelas que nos permitissem minimizar a possibilidade de “falharmos” as janelas aquando da realização dos cortes.

Decidimos incluir os dentes em acrílico porque era impossível colocar os dentes numa posição estável nas garras do micrótopo se eles não tivessem uma estrutura maior e mais regular a eles associada. A alternativa seria incluí-los em Technovit®, sendo este tipo de

inclusão a “clássica”, mas ainda utilizada por alguns autores como é o caso do Arnold et al., 2007. Fomos encorajados a inovar um pouco e a testar a inclusão noutra tipo de material, para avaliarmos o seu desempenho. A técnica de inclusão em resina acrílica é bastante simples, com a vantagem de nós, médicos dentistas, trabalharmos regularmente com este tipo de material e portanto sabermos como o devemos manipular para obter os resultados desejados. No entanto detectámos que a técnica de inclusão dos dentes na resina acrílica é atreita a algum tipo de mal-posicionamento do dente no interior do acrílico, uma vez que a anatomia dentária é algo de muito pouco regular – havia a possibilidade do dente se deslocar antes da tomada de presa do material que o circundava. Tentámos minimizar esses erros mantendo o dente preso por uma pinça metálica de pontas estriadas até o material resinoso ganhar presa, de forma que nos permitisse ter certeza que a movimentação do dente seria pouco provável (uma vez que a reacção de polimerização entre os dois componentes do acrílico utilizado é uma reacção exotérmica, usámos este facto como indicador de estado de polimerização: quando o acrílico começava a ficar quente era sinal que a reacção já estava num ponto tal que era irreversível e portanto garantia de imutabilidade).

Quanto às soluções de desmineralização utilizadas, escolhemos estes valores de pH em específico por sabermos *a priori* que uma solução com pH 3,5 iria desmineralizar o esmalte na maioria senão em todos os casos, sendo que é um valor de pH perfeitamente usual e atingível aquando da realização de uma dieta normal: o sumo natural de uva tem um pH de 3,2; o sumo de toranja um pH de 3,4 e o sumo de maçã um pH de 3,6 (Davis et al., 2009). O sumo de laranja tem valores de pH na ordem dos 3,85 (Amaechi, Higham & Edgar, 1999). Estes valores de pH são portanto perfeitamente passíveis de acontecer ao nível da cavidade oral, particularmente no caso de indivíduos que comam frutas ácidas ou bebam sumos de fruta naturais. Também deve ser tomada particular atenção ao caso de pessoas que vomitem de forma crónica (por exemplo no caso de pacientes anoréticos ou com bulimia nervosa), que tomem medicamentos ácidos (como é o caso do ácido acetilsalicílico ou do ácido ascórbico), que sejam consumidores de algumas drogas de abuso (de cocaína ou de ecstasy em especial), entre outros casos ainda mais particulares (Amaechi & Higham, 2005). Os valores de pH de 4,5 e 5,5 foram escolhidos tendo como base a curva de Stephan e mais particularmente a dinâmica de todo o processo carioso, no qual se combinam acções desmineralizadoras e remineralizadoras (*Figura 11*), a qual defende que o pH crítico para o surgimento de cárie dentária se situa entre os 4,5 e os 5,5. Escolhemos portanto estes dois valores para expor as peças dentárias constituintes da nossa amostra. O valor de pH de 6,8 é o valor médio

fisiológico da cavidade oral (Aframian et al., 2006), pelo que optámos por também o incluir, com o intuito de verificar se haveria alguma alteração histológica dentária neste valor.

3. Resultados

Quanto aos resultados obtidos no nosso estudo deparamo-nos com algumas diferenças respeitantes ao método utilizado. Optámos por “calibrar” o programa que utilizámos para fazermos as medições (Photoshop CS4® versão 11.0.1) em milímetros, sendo que há autores que usam outras unidades de medida, como é o caso de micrómetros médios (Davis et al., 2009) ou micrómetros (Elton et al., 2009). Depois de realizarmos as medições em todos os dentes e uma vez que o nosso objectivo é fazer a comparação entre as peças dentárias, passámos a denominar as nossas unidades de medida de “unidades arbitrárias”, tendo em conta que não sabemos se, de facto, a unidade “milímetro” considerada pelo software de medição corresponde, na realidade, a um milímetro. Tal facto pode ficar a dever-se à também diferença ao nível de obtenção das imagens a tratar: no nosso caso utilizámos o microscópio óptico, sendo que os autores atrás referidos utilizaram a microrradiografia (Elton et al., 2009) ou o microscópio de luz polarizada (Davis et al., 2009). As técnicas utilizadas para quantificar a perda de substância dentária durante a desmineralização nos dias que correm são tão díspares que vão desde técnicas de medição da dureza de superfície, a nanoindentações, a profilometria, a microrradiografia, à análise química, às técnicas microscópicas – microscopia de varrimento, espectroscopia de raios X, entre outras (Barbour & Rees, 2004). Perante este cenário temos que ter consciência que, independentemente da técnica que escolhamos para pôr em prática, esta terá sempre vantagens e desvantagens. Cabe-nos a nós tentar reunir a maior quantidade de informação de cada uma e, se possível, conciliar as vantagens de umas com as das outras.

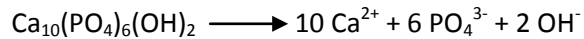
Os resultados que encontrámos – no grupo de pH 3,5 todos os dentes terem sofrido desmineralização; no grupo de pH 4,5 alguns dentes terem sofrido desmineralização e nos grupos de pH 5,5 e 6,8 nenhum dente ter sofrido desmineralização – vão de encontro a outros artigos que consultámos.

Amaechi, Higham & Edgar (1999) sujeitaram dentes ao contacto com sumo de laranja natural (pH 3,85 ± 0,05) durante 6, 8, 10 e 12 horas e verificaram que a perda mineral do esmalte e a profundidade da lesão variavam numa proporção directa com a duração da

exposição. O nosso estudo não corrobora estes resultados, uma vez que não temos maior profundidade da lesão nos dentes com contacto de 14 dias, quando comparados com os de 24 horas. Tal facto poderá dever-se à diferença significativa na grandeza destes valores temporais. Estes autores testaram variações de apenas 2 horas entre grupos, enquanto nós testámos valores bastante mais díspares. No nosso entender, poderemos estar perante uma explicação baseada no tempo que o esmalte leva a entrar em equilíbrio com o ácido circundante. Se este equilíbrio for atingido num período de tempo curto, o dente poderá sofrer desmineralização nas primeiras horas de contacto, sendo que depois de esse equilíbrio ser estabelecido, a sua estrutura se mantém inalterada durante o resto do tempo, não sofrendo uma desmineralização adicional. A única forma que teríamos para testar esta hipótese era podermos utilizar um medidor de pH colocado em contínuo na solução ácida e irmos acrescentando o ácido láctico necessário para o pH da solução ser praticamente constante e igual aos valores pretendidos. Mas não podemos ignorar o facto que este projecto foi levado a cabo “em ambulatório”, sendo que esta sugestão só seria viável se a exposição ao ácido acontecesse ininterruptamente em ambiente laboratorial.

Quando realizámos as medições nas imagens obtidas através do microscópio, dos cortes dos dentes desmineralizados, deparámo-nos com a notória existência de duas áreas distintas. Analogamente ao referenciado por Elton e colaboradores (2009) as imagens do grupo exposto à solução de pH 3,5 apresentam uma cratera de desmineralização e uma zona inferior a essa (no sentido de progressão esmalte – polpa) correspondente a esmalte com apenas cerca de 95% do conteúdo mineral do esmalte saudável. A nível de imagem surge-nos como um halo, que nos prova a progressão do evento desmineralizador de uma forma contínua, atravessando o esmalte e dirigindo-se à dentina. Haverá portanto perda de iões de forma progressiva, antes do esmalte aparecer cavitado. No grupo dos dentes expostos à solução de pH 4,5 é frequente vermos apenas essa zona de esmalte com propriedades inferiores àsquelas fisiológicas, sendo que já não é habitual encontrarmos a “cratera”, ou seja, a perda de substância com consequente formação de uma cavidade. É de salientar o facto que considerámos como profundidade total de desmineralização a soma da profundidade da cavidade (a cratera) mais o tal “halo” de desmineralização, como é aconselhado por Amaechi e Higham (2005) quando afirmam que “a profundidade de uma lesão de erosão consiste na profundidade da cratera mais a profundidade do tecido de desmineralização na base da lesão”.

Barbour & Rees (2004) referem-se às várias técnicas existentes de quantificação de perda de substância dentária durante a ocorrência de fenómenos de erosão, sendo que uma delas é denominada “análise química”. Esta técnica baseia-se no pressuposto que, quando o dente entra em contacto com soluções ácidas, existe uma dissolução de esmalte e hidroxiapatite, com libertação de iões hidroxilo (OH^-), segundo a equação:



Ou seja, medindo a mudança de pH da solução é possível determinar a taxa de libertação dos iões OH^- , o que traduz a taxa de dissolução do esmalte e da hidroxiapatite. Quando o dente é imerso na solução ácida, começa a dissolver-se, libertando iões OH^- que neutralizam os iões H^+ e causam a descida do valor de pH.

Nos nossos dentes expostos às várias soluções de desmineralização foi este o fenómeno que ocorreu. O dente foi perdendo iões para a solução desmineralizadora, até ao ponto de entrar em equilíbrio iónico com esta, ou seja, já não ocorrer nem libertação de iões OH^- por parte do esmalte e da hidroxiapatite nem neutralização dos iões H^+ da solução ácida. Esta questão terá particular interesse na justificação da razão pela qual encontramos resultados tão diferentes nos dentes que colocámos em contacto com a mesma solução de ácido láctico. Ao que parece terá havido dentes que rapidamente entraram em equilíbrio com a solução envolvente, sendo que outros tiveram que sofrer uma desmineralização mais acentuada para obterem tal equilíbrio. Toda esta reflexão nos leva a crer que o factor dominante de todo o processo será o conjunto de características que o dente possui, possivelmente determinadas por factores hereditários e de formação e não propriamente dos factores externos, como sejam o pH da solução desmineralizadora, o tempo e a forma de exposição.

Houve um dente em particular que nos conduziu a uma reflexão mais profunda acerca do fenómeno ocorrido a nível do esmalte, que foi o dente codificado como A3C50 (*Figura 42*) – dente sujeito à solução desmineralizadora com pH 3,5 (A), durante 7 dias (3) e de forma contínua (C). A imagem que obtivemos não é característica de nenhuma patologia em especial, e digamos que é a imagem-chave, que nos permitirá afirmar quase com certeza absoluta que o esmalte dentário não é *a priori* todo igual, isto é, poderá haver diferenças a nível de constituição de esmalte de pessoa para pessoa, e quem sabe de dente para dente.

Descartando qualquer erro de manipulação deste dente a nível de protocolo prático, uma vez que os dentes foram todos tratados pela mesma pessoa, no mesmo dia e com recurso aos mesmos materiais e instrumentos, podemos pensar que existirá algo neste dente que o caracteriza e diferencia de todos os outros utilizados neste trabalho. Temos a certeza que o dente macroscopicamente era considerado hígido e só essa característica permitiu que reunisse os critérios de inclusão necessários para ser englobado nesta experiência.

O esmalte dentário pode apresentar alterações genómicas, como seja a hipoplasia de esmalte, a hipomineralização do mesmo e a amelogenese imperfeita e outras alterações como consequências da administração de determinados fármacos, tendo estas repercussões sobretudo ao nível da coloração. No que diz respeito às três primeiras entidades sabemos que são de origem genómica e que afectam a estrutura e a aparência clínica dos dentes e que têm uma prevalência que varia de 1:700 a 1:14000 dependendo das populações estudadas (Crawford, Aldred & Bloch-Zupan, 2007). Na amelogenese imperfeita, o esmalte pode ser hipoplásico, hipomineralizado ou ambos, e os dentes afectados (todos ou a grande maioria) podem ter apenas alterações de cor ou estarem francamente fragilizados, sendo que é possível a sua desintegração – quer em período pré-eruptivo, quer em período pós-eruptivo. Fenotipicamente pode ser dividida em várias formas clínicas, dependendo do tipo de defeito e do estadió da formação do esmalte alterado: forma hipoplásica, hipomineralizada e hipomatura. O esmalte hipoplásico pode ser um esmalte “picotado”, com depressões, sem homogeneidade de superfície. O esmalte hipomineralizado é mole e com alterações de cor. O esmalte hipomaturado é de espessura e dureza normais mas com uma superfície branca opaca externa (esta forma pode ser confundida com lesões de fluorose). Todas estas realidades podem co-existir no mesmo dente. Podemos afirmar com relativa certeza que o nosso dente A3C50 não possuía nenhum destes tipos de alteração, uma vez que antes de ser incluído neste estudo foi cuidadosamente inspeccionado e fenotipicamente foi considerado como hígido, ou seja, como sendo um dente saudável reunindo todas as características de tal.

Outra questão na qual temos também que pensar é nas lesões de fluorose, como já foi referido anteriormente. A fluorose dentária traduz-se por uma alteração na aparência dos dentes, causada pela ingestão de quantidades de flúor superiores às consideradas adequadas, aquando da formação dos dentes afectados (American Dental Association). As lesões são normalmente de cor branca, opacas, e estão localizadas mais frequentemente nas faces vestibulares dos incisivos superiores, uma vez que estes dentes têm o seu período de formação entre o momento do nascimento e os 6 anos de idade (idade média de erupção). Os

terceiros molares não são dentes que sofram este tipo de alterações, uma vez que estas refletem quantidades de flúor ingeridas aquando do período de formação e maturação dos dentes e no caso dos terceiros molares estaríamos a falar seguramente depois dos 10 anos de idade.

A tabela que se segue (*Figura 59*) traduz a classificação proposta por H. T. Dean em 1942, baseada em critérios clínicos, de descrição da aparência do esmalte. O autor estabelece 5 estadios de gravidade das lesões, do grau “questionável” ao grau “severo”.

Classification	Criteria-Description of Enamel
Normal	Smooth, glossy, pale creamy-white translucent surface
Questionable	A few white flecks or white spots
Very Mild	Small opaque, paper-white areas covering less than 25% of the tooth surface
Mild	Opaque white areas covering less than 50% of the tooth surface
Moderate	All tooth surfaces affected; marked wear on biting surfaces; brown stain may be present
Severe	All tooth surfaces affected; discrete or confluent pitting; brown stain present

Figura 59 - Classificação da fluorose dentária, por H. T. Dean, em 1942

O dente que nos causa esta reflexão também não reunia nenhum destes sinais, por um lado porque todos os dentes incluídos no estudo eram terceiros molares e já foi explicada a razão pela qual não surgem lesões de fluorose nestes dentes, e por outro lado porque à inspecção visual, os dentes tinham uma aparência normal – de dente hígido – não apresentando quaisquer tipos de manchas ou linhas, nem nenhuma alteração de cor (branca ou castanha).

Continuando na nossa linha de pensamento, temos também que descartar a possibilidade de o dente em questão possuir algum tipo de lesão cariosa, mesmo que em estadio inicial de desenvolvimento. A argumentação para refutar esta possibilidade baseia-se no facto que a grande maioria, senão a totalidade, dos dentes utilizados neste estudo são terceiros molares extraídos por motivos ortodônticos, ou seja, extraídos a pacientes jovens, nas bocas dos quais acabaram por permanecer durante períodos de tempo curtos. Este facto torna muito menos provável o desenvolvimento de lesões de cárie (não esqueçamos também que alguns dos dentes foram extraídos quando estavam inclusos ou semi-inclusos, o que minimiza ainda mais a probabilidade desta ocorrência). Por outro lado conseguimos garantir com alguma certeza que os dentes não apresentariam lesões de cárie iniciais (as características manchas opacas, ocasionadas pela desmineralização do esmalte) pela inspecção cuidada que foi realizada no início do trabalho, aquando da selecção dos dentes que reuniam os critérios de

inclusão adoptados pelo operador. Pelos mesmos motivos descartamos também a patologia associada à desmineralização ácida dos dentes – erosão dentária.

Há ainda um outro factor que não podemos deixar de referir, que é a possibilidade dos indivíduos a quem foram extraídos os dentes estarem a ser medicados com alguns fármacos, com repercussões a nível da cavidade oral.

Capítulo VII
CONCLUSÕES

A análise cuidada dos resultados que obtivemos no nosso trabalho, à luz das informações recolhidas nos estudos referidos nos capítulos da revisão da literatura e da discussão dos resultados, permitiu-nos extrair as seguintes conclusões:

1. O ácido láctico produz efectivamente lesões de desmineralização no esmalte de dentes hígidos quando em actuação solitária, sem ser necessária a associação de nenhum outro tipo de agente causal.
2. Os valores de pH da solução de ácido láctico necessários para causar lesões de desmineralização são bastante díspares, sendo que, no estudo conduzido por nós, valores de pH de 3,5 desmineralizam a totalidade dos dentes desse grupo e valores de pH de 4,5 desmineralizam cerca de metade (56,25%) dos dentes pertencentes a esse grupo. Valores de pH de 5,5 e 6,8 parecem não ser suficientes para causarem desmineralização passível de ser medida com recurso a microscopia óptica.
3. No que nos foi possível verificar, e na experiência que conduzimos, parece não haver uma relação directa entre tempo de exposição e profundidade de desmineralização. Temos dentes que estiveram mais tempo em contacto com o ácido, mas, no entanto, apresentam profundidades de desmineralização inferiores a outros dentes cujo contacto foi substancialmente menor (quando consideramos a grandeza tempo). Sendo mais objectivos afirmamos que o dente que sofreu uma maior desmineralização, no grupo sujeito à solução de desmineralização com pH de 4,5, apenas esteve em contacto com o ácido durante 7 dias, sendo que aqueles cujo contacto foi o dobro (14 dias) sofreram desmineralização numa menor profundidade.
4. No nosso entender, neste estudo, pudemos constatar que a profundidade de desmineralização é uma variável que não depende somente do valor de pH da solução desmineralizadora e do tempo de exposição, como poderia ser inferido à partida, mas depende sobretudo do próprio dente que é sujeito ao contacto com o ácido. As características minerais do dente parecem ser o factor mais importante a ter em conta quando pensamos em profundidade de desmineralização.
5. Não encontrámos diferenças estatisticamente significativas entre os dentes sujeitos ao contacto com a solução de desmineralização de forma contínua e aqueles sujeitos apenas a um contacto intermitente, após aplicação do teste t para

amostras independentes. Esta conclusão é válida quer para o grupo de exposição à solução de ácido láctico com pH 3,5, quer para o grupo de exposição à solução de ácido láctico com pH 4,5.

6. O padrão das lesões de desmineralização provou ser completamente diferente, não havendo um critério para o prever. Temos dentes com padrões distintos, havendo alguns em que houve desmineralização contínua da janela de exposição, outros em que há como que uma desmineralização “intermitente”, havendo áreas de desmineralização intercaladas com outras que permanecem mineralizadas, sendo que há um dente em que o padrão é completamente diferente de todos os outros e para o qual não obtemos nenhum tipo de explicação teórica. Esse dente constituirá por si a prova que existe um factor inerente ao próprio dente e não às condições de manipulação ou às características da exposição à solução de desmineralização.

Limitações do estudo. Perspectivas futuras

Este estudo, como pelo menos a maioria, apresenta algumas limitações. Uma delas tem a ver com as soluções de desmineralização, mais concretamente com a certeza de que os dentes estiveram efectivamente, e de forma contínua, expostos às soluções de ácido láctico com os valores de pH estabelecidos à partida. Com o passar dos dias (efeito mais notório nos dentes sujeitos às soluções de desmineralização por um período de tempo mais alargado), poderá ter havido alteração no valor de pH da solução em contacto com a peça dentária. Para colmatar esta limitação poderíamos, se tivéssemos optado por realizar a experiência a nível laboratorial, ter monitorizado o pH em tempo real, efectuando as medições nos frascos que continham os dentes. Depois restava a obrigação de ajustar o pH da solução envolvente, no sentido de manter os valores que sabemos, com certeza, serem característicos das soluções de ácido láctico à partida. Outra limitação com alguma importância que identificámos prende-se com o facto de os dentes que foram englobados neste estudo serem obrigatoriamente diferentes, por não pertencerem todos ao mesmo indivíduo. Não há como garantir homogeneidade a nível de tecidos duros, mesmo com as mesmas características fenotípicas quando observados a olho nu. Temos portanto um factor que não controlámos, estando esse factor directamente relacionado com os resultados que obtivemos.

Quanto às perspectivas futuras penso que seria muito interessante continuar nesta linha de investigação, nomeadamente tentar perceber a razão pela qual encontramos um dente com uma imagem microscópica tão diferente dos demais. Talvez a explicação daquele padrão encontrado venha a esclarecer alguns factos que se prendem, a nível clínico, com a incidência de cárie nalguns indivíduos, mesmo naqueles com bons níveis de higiene oral. Acredito que variações importantes na estrutura mineral dentária, com consequente aumento da susceptibilidade à desmineralização, venha ajudar ao conhecimento científico do momento no que diz respeito a incidência de lesões cariosas. Outro ponto que, na minha opinião, necessita de mais alguma atenção, é o doseamento das quantidades de lactato que efectivamente são segregadas pelas glândulas salivares para a cavidade oral, aquando da realização de exercício físico. Esta quantificação seria interessante, bem como o estudo oral mais aprofundado, *in vivo*, de atletas sujeitos a estas condições. Penso que também deveria ser incluído o estudo paralelo acerca das características salivares destes indivíduos, bem como da sua implicação a nível de tamponamento dos ácidos presentes na cavidade oral.

Capítulo VIII

BIBLIOGRAFIA

Aframian DJ, Davidowitz T, Benodiel R. (2006) The distribution of oral mucosal pH values in healthy saliva secretors. *Oral Diseases* 12 : 420-3

Ahmad N, Gelesko S, Shugars D, White RP, Blakey G, haug RH, Offenbacher S, Phillips C. (2008) Caries experience and periodontal pathology in erupting third molars. *J Oral Maxillofac Surg* 66 : 948-53

Amaechi BT, Higham SM. (2005) Dental erosion: possible approaches to prevention and control. *Journal of Dentistry* 33 : 243-52

Amaechi BT, Higham SM, Edgar WM. (1999) Factors influencing the development of dental erosion in vitro: enamel type, temperature and exposure time. *Journal of Oral Rehabilitation* 26 : 624 – 30

American Dental Association. (2005) Fluoridation facts. 1-69

Amerongen JP, Loveren C, Kidd EAM. (2001) Caries Management: Diagnosis and Treatment Strategies. In: Summit JB, Robbins JW, Schwartz RS. *Fundamentals of Operative Dentistry – a contemporary approach*. Quintessence Publishing Co, Inc, 2ª edição, 70-90

Arnold WH, Sonkol T, Zoellner A, Gaengler P. (2007) Comparative study of in vitro caries-like lesions and natural caries lesions at crown margins. *Journal of Prosthodontics* 16 (6) : 445 – 51

Axelsson. (2000) Etiologic factors involved in Dental Caries. In: Diagnosis and risk prediction of Dental Caries. Quintessence Publishing Co, Inc, 1-42

Baelum V, Fejerskov O. (2003) Caries diagnosis: “a mental resting place on the way to intervention”? In: Fejerskov O, Kidd E. *Dental Caries – The disease and its clinical management*. Blackwell Munksgaard 101-10

Barbour ME, Rees JS. (2004) The laboratory assessment of enamel erosion: a review. *Journal of Dentistry* 32 : 591-602

Baum BJ. (1993) Principles of saliva secretion. *Annals New York Academy of Sciences* 694 : 17-23

Ben-Aryeh H, Roll N, Lahav M, Dlin R, Hanne-Paparo N, Szargel R, Shein-Orr C, Laufer D. (1989) Effect of exercise on salivary composition and cortisol in serum and saliva in man. *J Dent Res* 68 (11) : 1495-7

Brooks GA, Brown M, Butz CE, Sicurello JP, and Dubouchand H. (1999) Cardiac and skeletal muscle mitochondria have a monocarboxylate transporter MCT1. *J Appl Physiol* 87 : 1713-8

Brooks GA, Dubouchaud H, Brown M, Sicurello J, Butz C. (1999) Role of mitochondrial lactate dehydrogenase and lactate oxidation in the intracellular lactate shuttle. *Proc. Natl, Acad. Sci. USA* 96 : 1129-34

Brooks GA. (1999) Lactate: glycolytic product and oxidative substrate during sustained exercise in mammals – the “lactate shuttle”. In *Comparative Physiology and Biochemistry: Current Topics and Trends*, vol. A, *Respiration-Metabolism-Circulation*, ed. Gilles R, 208-218, Springer, Berlim

Brooks GA. (2001) Lactate doesn't necessarily cause fatigue: why are we surprised? *Journal of Physiology* 536.1

Brooks GA. (2002) Lactate shuttle – between but not within cells? *Journal of Physiology* 541.2 : 333

Butz C, McClelland GB, Brooks GA. (2004) MCT1 confirmed in rat striated muscle mitochondria. *J Appl Physiol* 97 : 1059-66

Carlsson J, Hamilton IR. (1996) Differential toxic effects of lactate and acetate on the metabolism of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguis*. *Oral Microbiology and Immunology* 11(6) : 412-9

Chatham JC. (2002) Lactate – the forgotten fuel! *Journal of Physiology* 542.2 : 333

Chauncey HH, Shannon IL. (1965) Glandular mechanisms regulating the electrolyte composition of human parotid saliva. *Annals New York Academy of Sciences* : 830-8

Chiappin S, Antonelli G, Gatti R, De Palo EF. (2007) Saliva specimen: a new laboratory tool for diagnostic and basic investigation. *Clinica Chimica Acta*; 383 : 30-40

Chicharro JL, Lucía A, Pérez M, Vaquero AF, Ureña R. (1998) Saliva composition and exercise. *Sports Med* 26 (1) : 17-27

Crawford PJM, Aldred M, Bloch-Zupan A. (2007) Amelogenesis imperfect. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 2 : 17

Dashper SG, Reynolds EC. (2000) Effects of Organic Acid Anions on Growth, Glycolysis, and Intracellular pH of Oral Streptococci. *J Dent Res* 79 (1) : 90-6

Davis RE, Marshall TA, Qian F, Warren JJ, Wefel JS. (2009) Proteção *in vitro* contra a erosão dentária proporcionada por sumos 100% enriquecidos com cálcio, disponíveis no mercado. *Journal of the American Dental Association* 9 (2) : 41-7

Dubouchaud H, Butterfield GE, Wolfel EE, Bergman BC, Brooks GA. (2000) Endurance training, expression, and physiology of LDH, MCT1, and MCT4 in human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 278: E571-E579

Eisenburger M. (2009) Degree of mineral loss in softened human enamel after acid erosion measured by chemical analysis. *Journal of Dentistry* 37 : 491-4

Elton V, Cooper L, Higham SM, Pender N. Validation of enamel erosion *in vitro*. *Journal of Dentistry* 37 : 336-41

Fitts RH. (2003) Mechanisms of muscular fatigue. In *Principles of Exercise Biochemistry*, 3ª edição, ed. Poortmans JR, 279-300, Karger, Basel

Gladden LB. (2004) Lactate metabolism: a new paradigm for the third millennium. *J Physiol* 558 (1) : 5-30

Guyton & Hall. (2000) Sports Physiology. In *Textbook of Medical Physiology*, 10ª edição, ed. W. B. Saunders Company, 967-78, Philadelphia, Pennsylvania

Halestrap AP, Wang XM, Poole RC, Jackson VN, Price NT. (1997) Lactate transport in heart in relation to myocardial ischemia. *American Journal of Cardiology* 80 : A17-25

Handy J. (2006) Lactate – The bad boy of metabolism, or simply misunderstood? *Current Anaesthesia & Critical Care* 17 : 71-6

Hashimoto T, Hussien R, Brooks GA. (2006) Colocalization of MCT1, CD147, and LDH in mitochondrial inner membrane of L6 muscle cells: evidence of a mitochondrial lactate oxidation complex. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 290 : E1237-E1244

Hermansen L, Osnes JB. (1972) Blood and muscle pH after maximal exercise in man. *J Appl Physiol* 32 : 304-8

Jensdottir T, Nauntofte B, Buchwald C, Bardow A. (2005) Effects of sucking acidic candy on whole-mouth saliva composition. *Caries res* 39 : 468-74

Jorfeldt L. (1970) Metabolism of L (+) – lactate in human skeletal muscle during exercise. *Acta Physiol Scand* 338 (suppl.) 1-67

Juel C, Halestrap AP. (1999) Lactate transport in skeletal muscle – role and regulation of the monocarboxylate transporter. *J Physiol* 517 (3) : 633-42

Juel C, Lunbø C, Sander M, Calbert JAL, Van Hall G. (2003) Human skeletal muscle and erythrocyte proteins involved in acid-base homeostasis: adaptations to chronic hypoxia. *J Physiol* 548 (2) : 639-48

Juel C, Nielsen JJ, Bangsbo J. (2000) Exercise-induced translocation of Na⁺-K⁺ pump subunits to the plasma membrane in human skeletal muscle. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 278 : R1107-R1110

Juel C, Pilegaard H. (1998) Lactate/H⁺ transport kinetics in rat skeletal muscle related to fibre type and changes in transport capacity. *Pflügers Arch – Eur J Physiol* 436 : 560-4

Juel C. (2001) Current aspects of lactate exchange: lactate/H⁺ transport in human skeletal muscle. *Eur J Appl Physiol* 86 : 12-6

Juel C. (2006) Training-induced changes in membrane transport proteins of human skeletal muscle. *Eur J Appl Physiol* 96 : 627-35

Kristensen M, Albertsen J, Rentsch M, Juel C. (2005) Lactate and force production in skeletal muscle. *J Physiol* 562 (2) : 521-6

Macek MD, Beltrán-Aguilar ED, Lockwood SA, Malvitz DM. (2003) Updated comparison of the caries susceptibility of various morphological types of permanent teeth. *J Public Health Dent* 63 (3) : 174-82

Magalhães AC, Wiegand A, Rios D, Honório HM, Buzalaf MAR. (2009) Insights into preventive measures for dental erosion. *Journal of Applied Oral Science* 17 (2) : 75 – 86

Margolis HC, Zhang YP, Lee CY, Kent RL, Moreno EC. (1999) Kinetics of demineralization *in vitro*. *J Dent Res* 78 (7) : 1326 – 35

McClelland GB, Brooks GA. (2002) Changes in MCT1, MCT4 and LDH expression are tissue specific in rats after long-term hypobaric hypoxia. *J Appl Physiol* 92 : 1573-84

McClelland GB, Khanna S, Gonzalez GF, Butz CE, and Brooks GA. (2003) Peroxisomal membrane monocarboxylate transporters: evidence for a redox shuttle system? *Biochem Biophys Res Commun* 304 : 130-5

McDermott JC, Bonen A. (1992) Glyconeogenic and oxidative lactate utilization in skeletal muscle. *Can J Physiol Pharmacol* 70 : 142-9

McIntyre JM, Featherstone JDB, Fu J. (2000) Studies on dental root caries. 1: Comparison of natural and artificial root caries lesions. *Australian Dental Journal* 45 (1) : 24 – 30

Messonnier L, Kristensen M, Juel C, Denis C. (2007) Importance of pH regulation and lactate/H⁺ transport capacity for work production during supramaximal exercise in humans. *J Appl Physiol* 102 : 1936-44

Moss KL, Beck JD, Mauriello SM, Offenbacher S, White RP. (2007) Risk indicators for third molar caries and periodontal disease in senior adults. *J Oral Maxillofac Surg* 65 : 958-63

Nauntofte B, Tenovou JO, Lagerlöf F. (2005) Secreção e composição da saliva. In: Fejerskov O, Kidd E, editors. *Cárie Dentária – A Doença e seu Tratamento Clínico*. Livraria Santos Editora 7-27

Nielsen JJ, Kristensen M, Hellsten Y, Bangsbo J, Juel C. (2003) Localization and function of ATP-sensitive potassium channels in human skeletal muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 284 : R558-R563

Nielsen OB, de Paoli F & Overgaard K. (2001) Protective effects of lactic acid on force production in rat skeletal muscle. *J Physiol* 536 : 161-6

Nikiforuk, G. (1985) Understanding Dental Caries 1. Etiology and Mechanisms – Basic and Clinical Aspects, Karger 60-81

Pellerin L, Pellegrini G, Martin JL, and Magistretti PJ. (1998) Expression of monocarboxylate transporter mRNAs in mouse brain: support for a distinct role of lactate as an energy substrate for the neonatal vs. adult brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 95 : 3990-5

Pereira A. (1993) Cáries dentárias - Etiologia, Epidemiologia e Prevenção. Edição Medisa 13-9

- Pilegaard H, Domino K, Noland T, Juel C, Hellsten Y, Halestrap AP, Bangsbo J.** (1999) Effect of high-intensity exercise training on lactate/H⁺ transport capacity in human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 276 : 255-61
- Pinto MDS, Lourenço MGV.** (1996) Equilíbrio em reacções de ácido-base. In: Pinto MDS, Lourenço MGV. *Química 12, Q12 teórico-prático*. Areal Editores, Porto 199 -263
- Proctor GB, Carpenter GH.** (2007) Regulation of salivary gland function by autonomic nerves. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical* 133 : 3-18
- Rasmussen HN, Van Hall G, Rasmussen UF.** (2002) Lactate dehydrogenase is not a mitochondrial enzyme in human and mouse vastus lateralis muscle. *J Physiol* 541.2 : 575-80
- Ribeiro LSP, Filho HT.** (2002) Remoção de lactate sangüíneo em diferentes velocidades na esteira rolante. *Rev Médica HSPV* 14 (30) : 7-12
- Santos RVT, Almeida ALR, Caperuto EC, Martins E, Costa Rosa LFBP.** (2006) Effects of a 30-km race upon salivary lactate correlation with blood lactate. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 145 : 114-7
- Shugars DA, Elter JR, Jacks MT, White RP, Phillips C, Haug RH, Blakey G.** (2005) Incidence of occlusal dental caries in asymptomatic third molars. *J Oral Maxillofac Surg* 63 : 341-6
- Street D, Bangsbo J, Juel C.** (2001) Interstitial pH in human skeletal muscle during and after dynamic graded exercise. *Journal of Physiology*; 537.3 : 993-8
- Van Hall G.** (2000) Lactate as a fuel for mitochondrial respiration. *Acta Physiol Scand* 168 : 643-56
- Wang S, Marchal F, Zou Z, Zhou J, Qi S.** (2009) Classification and management of chronic sialadenitis of the parotid gland. *Journal of Oral Rehabilitation* 36 : 2-8
- Wasserman K.** (1984) The anaerobic threshold to evaluate exercise performance. *Am Rev Respir Dis* 129 : S35-S40
- Welin-Neilands J, Svensäter G.** (2007) Acid Tolerance of Biofilm Cells of *Streptococcus mutans*. *Applied and Environmental Microbiology* 17 (73) : 5633-8

West NX, Hughes JA, Addy M. (2000) Erosion of dentine and enamel *in vitro* by dietary acids: the effect of temperature, acid character, concentration and exposure time. *Journal of Oral Rehabilitation* 27 : 875-80

Westerblad H, Allen DG & Lännergren J. (2002) Muscle fatigue: Lactic acid or inorganic phosphate the major cause? *News Physiol Sci* 17 : 17-21

White I, McIntyre J, Logan R. (2001) Studies on dental erosion: An in vitro model of root surface erosion, *Australian Dental Journal* 46 (3) : 203-7

Williams PL, Wawick R. (1980) Alimentary systems. In: Williams PL, Wawick R, editors. Gray's anatomy. 36th ed. Edinburgh: Churchill Livingstone 1267-81

Wilson MC, Jackson VN, Heddle C, Price NT, Pilegaard H, Juel C, Bonen A, Montgomery I, Hutter OF, Halestrap AP. (1998) Lactic acid efflux from white skeletal muscle is catalyzed by the monocarboxylate transporter isoform MCT3. *Journal of Biological Chemistry* 273.26 : 15920-6

Yoon H, Fanelli A, Grollman EF, and Ohilip NJ. (1997) Identification of a unique monocarboxylate transporter (MCT3) in retinal pigment epithelium. *Biochem Biophys Res Comm* 234 : 90-4